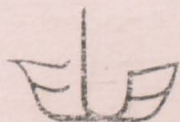
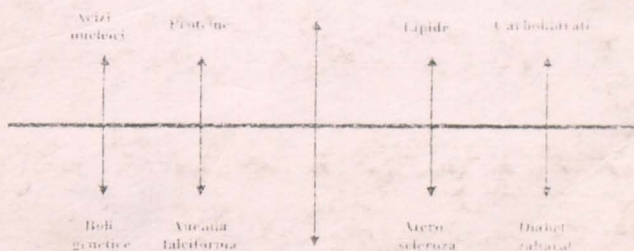


ILEANA CORNELIA FĂRCĂȘANU

MARIA IULIANA GRUIA

BIOCHIMIE MEDICALĂ



Editura Universității din București

ILEANA CORNELIA FĂRCĂȘANU

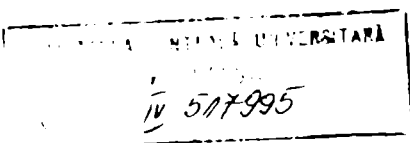
MARIA IULIANA GRUIA

BIOCHIMIE MEDICALĂ



Editura UNIVERSITĂȚII din BUCUREȘTI
2005

Referenți științifici: Prof. dr. Alexandru Gioabă
Prof. dr. Cornelia Cercasov



695

© Editura Universității din București
Șos. Panduri, 90-92, București - 050663; Telefon/Fax: 410.23.84
E-mail: editura_unibuc@yahoo.com
Internet: www.editura.unibuc.ro

B.C.U. Bucuresti



C20054266

Descrierea CIP a Bibliotecii Naționale a României
FĂRCĂȘANU, ILEANA-CORNELIA

Biochimie medicală / Ileana-Cornelia Fărcășanu,
Maria-Iuliana Gruia - București: Editura Universității
din București, 2005

Bibliogr.

ISBN 973-737-023-6

I. Gruia, Maria-Iuliana

577.1:61(075.8)

Cuvânt înainte

Obiectivul principal al biochimiei este de a elucidă la nivel molecular toate procesele chimice asociate vieții. Există o strânsă corelare între studiul biochimiei și toate celelalte științe ale vieții. Astfel, biochimia acizilor nucleici stă la baza geneticii, iar utilizarea genetica a condus la elucidarea multor capite din biochimie. Fiziologia, știința funcțiilor vitale, se suprapune aproape complet biochimiei. Imunologia utilizează numeroase tehnici biochimice, după cum multe tehnici imunologice și-au găsit o largă aplicabilitate în biochimie. Farmacologia și științele farmaceutice se bazează pe biochimie și fiziologie; în particular, majoritatea medicamentelor sunt metabolizate prin reacții catalizate de enzime. Otrăvurile, obiectul de studiu al toxicologiei, acționează prin reacții și procese biochimice. Tehnicile biochimice sunt utilizate din ce în ce mai mult pentru a studia aspectele de bază ale patologiei (cercetarea maladiilor de tipul afecțiunilor inflamatorii, degradarea celulară sau cancerul). Mulți cercetători din domeniile microbiologiei, zoologiei, botanicii folosesc preponderent tehnici biochimice. Toată această extindere a biochimiei nu este surprinzătoare, deoarece viața, așa cum o înțelegem noi, depinde de reacțiile și procesele biochimice. De fapt vechile bariere dintre științele vieții au început să cadă, iar biochimia a devenit limbajul comun prin care cercetătorii din aceste domenii se pot înțelege.

Lucrarea de față este destinată în mod special studenților Facultății de Chimie, secția Chimie Terapeutică, constituind un material didactic complementar cursului de „Biochimie Medicală”. Lucrarea este recomandată și studenților secției de Biochimie, precum și tuturor studenților chimiști care își aprofundează studiile legate de structura și activitatea compușilor bioorganici.

Scopul urmărit de noi a fost de a prezenta studenților un material care să descrie bazele biochimiei medicale într-o manieră clară, accesibilă și atractivă, reflectând în același timp progresele cele mai recente ale biochimiei, cu importanță în medicină. În cadrul științelor contemporane, biochimia s-a impus ca o disciplină de bază, cu implicații profunde în sfera științelor biologice teoretice și aplicate. Dezvoltarea dinamică și rapidă a biochimiei în ultimele decenii reprezintă una din cele mai remarcabile cuceriri ale științelor contemporane, iar apariția „Biochimiei medicale” sub o formă comprehensivă pentru studenții chimiști vine să umple un gol în seria cursurilor științifice de graniță.

Materialul prezentat urmărește în special înțelegerea și aprofundarea de către studenții chimiști a elementelor de biochimie care au o corelare directă cu aspectele clinice de diagnostic, prevenție și tratament. Științele medicale au în vedere două scopuri majore: 1) elucidarea și menținerea stării de sănătate și 2) elucidarea mecanismelor de producere a bolilor și stabilirea unor tratamente eficiente a acestor boli. Biochimia are un impact major asupra ambelor preocupări ale științelor medicale, existând o strânsă corelație între progresele din ambele domenii. Astfel, studiile biochimice au dus la înțelegerea multor aspecte legate de starea de sănătate și starea de boală, iar pe altă parte, studiul diverselor aspecte ale stării de sănătate-boală a deschis noi orizonturi în înțelegerea proceselor biochimice. În acest context, tratamentul medical este adânc înrădăcinat în cunoașterea biochimiei, iar practicarea medicinei și a cercetării medicale nu poate avea loc fără solide cunoștințe biochimice.

Majoritatea, dacă nu chiar toate bolile au manifestări legate de anormalități la nivelul moleculelor, reacțiilor sau proceselor biochimice. În lucrarea de față sunt prezentate capitole fundamentale de biochimie (proteine, peptide și aminoacizi; nivele superioare de organizare a structurii proteinelor; enzime; vitamine și minerale; zaharide; lipide; structura acizilor nucleici), făcându-se la fiecare capitol corelări cu aspectele clinice corespunzătoare. Prezentarea unor noțiuni de ultimă oră (genomică, proteomică, medicină preventivă, medicină nutriționistă) face ca această lucrare să se înscrie în tendința generală de aprofundare a studiului elementelor de graniță. Dorința noastră a fost ca lucrarea să conțină un limbaj accesibil, care să constituie un potențial ajutor pentru studenți în familiarizarea cu terminologia de ultimă oră folosită în lucrările cu caracter biochimic.

1. Biochimia și Medicina	9
2. Apa și pH-ul	13
2.1. Repartiția apei în organism	13
2.2. Rolurile apei în organism	13
2.3. Unele proprietăți fizico-chimice ale apei	14
3. Proteine, Peptide și Aminoacizi	22
3.1. Aminoacizii	22
3.1.1. Aminoacizi care intră în constituția proteinelor	23
3.1.2. Aminoacizi care nu intră în constituția proteinelor	27
3.1.3. Proprietățile aminoacizilor	28
3.1.4. Aminoacizi esențiali	34
3.2. Peptide	35
3.2.1. Clasificarea și nomenclatura peptidelor	35
3.2.2. Structura legăturii peptidice	36
3.2.3. Oligopeptide cu rol biologic	39
3.4. Structura proteinelor	42
3.3.1. Purificarea proteinelor	43
3.3.2. Determinarea structurii primare a proteinelor	47
4. Nivele Superioare de Organizare a Structurii Proteinelor	54
4.1. Clasificarea proteinelor	54
4.2. Structura secundară a proteinelor	56
4.2.1. Structura α -helix	56
4.2.2. Structura β -pleated sheet (planuri pliate)	58
4.2.3. Bucle și cotituri	60
4.3. Structura terțiară și cuaternară a proteinelor	61
4.3.1. Factorii care stabilizează structura terțiară și cuaternară	63
4.3.2. Denaturarea proteinelor	64
4.3.3. Determinarea experimentală a structurii tridimensionale a proteinelor	65

4.3.4. Boli neurologice cauzate de modificări în conformația proteinelor	65
4.3.5. Structura collagenului	66
4.3.6. Anumite insuficiențe genetice și nutriționale perturbă maturarea collagenului	68
5. Enzime. Mecanism de Acțiune	69
5.1. Clasificarea enzimelor	70
5.2. Grupări prostetice, cofactori și coenzime	71
5.3. Situsul activ	72
5.4. Mecanismele catalizei enzimatică	73
5.5. Determinarea activității enzimatică	79
5.6. Utilizarea enzimelor în stabilirea diagnosticului clinic	81
5.7. Cinetica enzimatică	83
5.7.1. Factorii care influențează viteza reacțiilor catalizate de enzime	86
5.7.2. Viteza reacțiilor enzimatică	88
5.8. Efectori enzimatici	97
5.8.1. Activatorii enzimatici	97
5.8.2. Inhibitorii enzimatici	98
5.9. Reacții enzimatică cu două sau mai multe substraturi	101
5.9.1. Reacții secvențiale sau reacții de substituție simplă	102
5.9.2. Reacții ping-pong	103
5.10. Reglarea activității enzimatică	104
5.10.1. Reglarea cantitativă a enzimelor	106
5.10.2. Reglarea activității catalitice	107
6. Vitamine și Minerale	114
6.1. Clasificarea vitaminelor	115
6.2. Vitaminele liposolubile	118
6.2.1. Vitamina A	118
6.2.2. Vitamina D (calciferolii)	122
6.2.3. Vitamina E	125
6.2.4. Vitamina K	129
6.3. Vitaminele hidrosolubile	132

6.3.1. Vitamina B ₁ (tiamina)	132
6.3.2. Vitamina B ₂ (riboflavina)	134
6.3.3. Niacina	136
6.3.4. Vitamina B ₆	138
6.3.5. Vitamina B ₁₂	140
6.3.6. Acizii folici	143
6.3.7. Acidul <i>para</i> -aminobenzoic	147
6.3.8. Biotina	147
6.3.9. Acidul pantotenic	149
6.3.10. Acidul lipoic	151
6.3.11. Vitamina C	152
6.3.12. Vitamina P	154
6.4. Mineralele esențiale	155
7. Zaharide	156
7.1. Monozaharidele (ozele)	157
7.1.1. Structura și izomeria ozelor (monozaharidelor)	157
7.1.2. Proprietăți chimice ale monozaharidelor	164
7.1.3. Principalii reprezentanți ai monozaharidelor	168
7.2. Dizaharidele	172
7.3. Polizaharidele	174
7.3.1. Homoglicanii	174
7.3.2. Heteroglicanii	177
8. Lipide	183
8.1. Clasificarea lipidelor	183
8.2. Roluri biologice ale lipidelor	184
8.3. Acizi grași	184
8.3.1. Acizi grași saturați	185
8.3.2. Acizi grași nesaturați	186
8.4. Prostaglandine. Eicosanoizi	189
8.5. Triglicilgliceroli (trigliceride)	193
8.6. Fosfolipide	194
8.7. Glicolipide	197
8.8. Steroizi	198

8.7.1. Colesterolul	199
8.7.2. Acizii biliari	200
8.9. Peroxidarea lipidelor	202
8.10. Orientarea lipidelor amfipatice la nivelul interfețelor ulei-apă	203
9. Structura Acizilor Nucleici	206
9.1. Nucleotide	206
9.1.1. Structura nucleozidelor și nucleotidelor	206
9.1.2. Alte baze prezente în structura acizilor nucleici	210
9.1.3. Rolul biologic al nucleotidelor	211
9.1.4. ATP: purtătorul biomolecular de energie chimică	213
9.1.5. Analogi sintetici ai nucleotidelor	214
9.2. Acizi nucleici	216
9.2.1. Structura ADN	216
9.2.2. Replicarea și transcripția ADN	222
9.2.3. Structura ARN	223
9.2.4. ARN mesager (mARN)	224
9.2.5. Codul genetic	226
9.2.6. ARN de transfer (tARN)	227
9.2.7. ARN ribozomal (rARN)	228
9.2.8. ARN nuclear de mici dimensiuni (snARN)	229
9.2.9. Nucleaze	229

1. Biochimia și Medicina

Biochimia poate fi definită ca știința implicată în studierea și descrierea proceselor chimice care se petrec în lumea vie (Gc. *bios*, “viață”). Unitatea structurală a organismelor vii o constituie **celula**. Astfel, biochimia mai poate fi definită ca știința implicată în descrierea la nivel molecular a constituenților celulei vii, precum și în descrierea reacțiilor și a proceselor suferite de aceștia. Biochimia cuprinde astfel părți extinse din domeniul **biologiei celulare, biologiei moleculare, și geneticii moleculare**.

Scopul principal al biochimiei este de a descrie și explica în termeni moleculari, toate procesele chimice asociate vieții. Pentru a atinge acest scop, biochimistii au izolat diferiți compuși prezenți în celule, le-au determinat structurile și le-au analizat funcțiile.

Există o strânsă corelare între studiul biochimiei și toate celelalte științe ale vieții. Astfel, biochimia acizilor nucleici stă la baza geneticii; pe de altă parte, utilizarea geneticii a condus la elucidarea multor capitole din biochimie. Fiziologia, știința funcțiilor vitale, se suprapune aproape complet biochimiei. Imunologia utilizează numeroase tehnici biochimice, după cum multe tehnici imunologice și-au găsit o largă aplicabilitate în biochimie. Farmacologia și științele farmaceutice se bazează pe biochimie și fiziologie; în particular, majoritatea medicamentelor sunt metabolizate prin reacții catalizate de enzime. Otrăvurile, obiectul de studiu al toxicologiei, acționează prin reacții și procese biochimice. Tehnicile biochimice sunt utilizate din ce în ce mai mult pentru a studia aspectele de bază ale patologiei (cercetarea maladiilor de tipul afecțiunilor inflamatorii, degradarea celulară sau cancerul). Mulți cercetători din domeniile microbiologiei, zoologiei, botanicii folosesc preponderent tehnici biochimice. Toată această extindere a biochimiei nu este surprinzătoare, deoarece viața, așa cum o înțelegem noi, depinde de reacțiile și procesele biochimice. De fapt vechile bariere dintre științele vieții au început să cadă, iar biochimia a devenit limbajul comun prin care cercetătorii din aceste domenii se pot înțelege.

Interdependența dintre biochimie și medicină a dus la progrese mari în ambele domenii.

Științele medicale au în vedere două scopuri majore: 1) elucidarea și menținerea stării de sănătate și 2) elucidarea mecanismelor de producere a bolilor și stabilirea unor tratamente eficiente a acestor boli. Biochimia are un impact major asupra ambelor preocupări ale științelor medicale. De fapt, relațiile biochimico-medicale reprezintă un drum cu doua sensuri. Pe o parte, studiile biochimice au dus la înțelegerea multor aspecte legate de starea de sănătate și starea de boala, iar pe alta parte, studiul

diverselor aspecte ale stării de sănătate-boală a deschis noi orizonturi în înțelegerea proceselor biochimice. De exemplu, era necesară cunoașterea structurii și funcțiilor proteinelor pentru a elucidă diferența biochimică dintre hemoglobina normală și hemoglobina din hematiile în “formă de seceră”. În același timp, analiza biochimică a hemoglobinei din hematiile în “formă de seceră” a contribuit semnificativ la înțelegerea structurii și funcțiilor hemoglobinelor atât normale cât și patologice. Un alt exemplu îl reprezintă studiul bolilor genetic-transmisibile, care a pus bazele domeniului numit genetica biochimică umană. În acest domeniu, eforturile depuse pentru înțelegerea maladiei numită hipercolesterolemia familială, care provoacă ateroscleroza timpurie, au dus la progrese dramatice în elucidarea funcțiilor receptorilor celulari și a mecanismelor de importare a colesterolului de către celulă.

Studiul oncogenelor în celulele canceroase au atras atenția asupra mecanismelor moleculare implicate în controlul creșterii celulare. Acestea și încă multe alte exemple subliniază rolul cercetării medicale în deschiderea unor căi noi în cercetarea fundamentală biochimică.

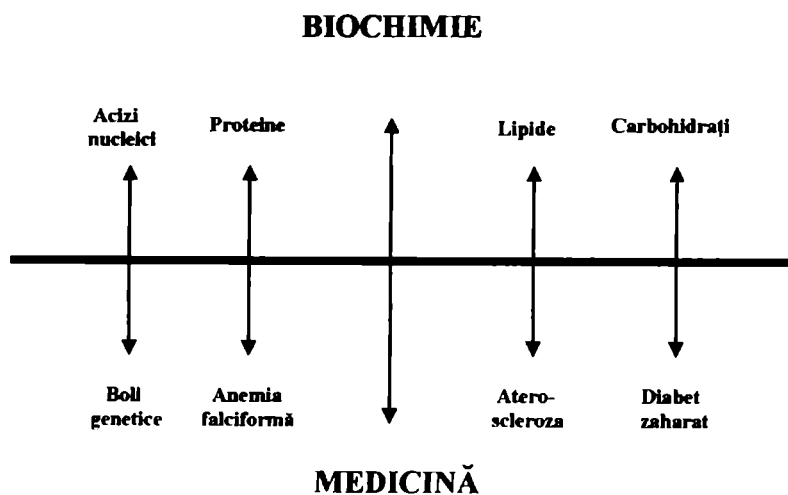


Fig. 1. Exemple care ilustrează corelații dintre medicină și biochimie.

Relațiile dintre medicină și biochimie au importante implicații pentru progresul celei dintâi. Atâta timp cât tratamentul medical este adânc înrădăcinat în cunoașterea biochimiei și a altor științe fundamentale, practicarea medicinei și a cercetării medicale nu poate avea loc fără solide cunoștințe biochimice. Acest principiu vine în conflict cu practicile „medicinei alternative”, care de cele mai multe ori nu se bazează pe o cunoaștere științifică.

Procesele biochimice normale stau la baza stării de sănătate. Organizația Mondială a Sănătății (OMS) definește starea de sănătate astfel: „nu numai absența bolilor și a infirmităților, ci și o stare de confort fizic, mental și social”. Dintr-un punct de vedere strict biochimic, sănătatea poate fi definită ca starea în care toate miile de reacții intra- și extracelulare care au loc în organism decurg în condițiile care asigură organismului șanse maxime de supraviețuire în stare funcțională. Desigur, acesta este un punct de vedere simplist și reducător, fiind evident că pentru a putea monitoriza starea de sănătate a unui organism este nevoie de cunoașterea aprofundată a principiilor biologice, dar și a celor psihologice și sociale.

Cercetările biochimice stau la baza medicinei nutriționiste și a medicinei preventive. O condiție importantă pentru menținerea stării de sănătate o constituie asigurarea prin alimentație a unui aport optim de substanțe, dintre care cele mai importante sunt **vitaminele**, anumiți **amino acizi**, anumiți **acizi grași**, diverse **minerale** și **apa**. Deoarece atât biochimia cât și medicina nutriționistă sunt preocupate de studiul diferitelor aspecte ale acestor substanțe chimice, există o strânsă relație între aceste două discipline. Mai mult decât atât, se fac din ce în ce mai multe eforturi de a menține starea de sănătate prin încercarea de a împiedica apariția bolilor, lucru care constituie obiectul **medicinei preventive**. În acest sens, se pune un accent din ce în ce mai mare pe aspectele profilactice de tratament, iar abordarea nutriționistă câștigă din ce în ce mai mult teren în prevenirea unor boli cum ar fi ateroscleroza sau cancerul. Iar stabilirea unui regim nutriționist corect este imposibil fără aprofundate studii biochimice.

Majoritatea bolilor au un fundament biochimic. Majoritatea, dacă nu chiar toate bolile au manifestări legate de anormalități la nivelul moleculelor, reacțiilor sau proceselor biochimice. Majoritatea factorilor care provoacă bolile la animale și om sunt următoarele:

1. Agenții fizici: traume mecanice, temperaturi extreme, schimbări bruște în presiunea atmosferică, radiații, șocuri electrice.
2. Agenți chimici: anumiți compuși toxici, medicamente, etc.
3. Agenți biologici: viruși, bacterii, fungi, paraziți.
4. Aport scăzut de oxigen: irigare sangvină insuficientă, scăderea capacității sangvine de a transporta oxigenul, otrăvirea enzimelor oxidative.
5. Anomalii genetice: congenitale, dobândite.
6. Reacții imune: anafilxie, maladii autoimune.
7. Dezechilibru nutrițional: deficiențe, excese.
8. Dezechilibru hormonal: hiposecreții, hipersecreții.

Toți acești factori pot afecta una sau mai multe reacții chimice sau molecule din organism. În lucrarea de față, veți întâlni multe exemple de boli cauzate de modificări biochimice; majoritatea sunt provocate de cauzele 5, 7 și 8. În majoritatea acestor cazuri, cercetările biochimice contribuie atât la stabilirea diagnosticului cât și a tratamentului.

Impactul secvențializării genomului uman asupra biochimiei și medicinei. Două grupuri de cercetători („International Human Genome Sequencing Consortium” și „Celera Genomics”, o companie privată) au fost implicate în proiectul descifrării genomului uman (HPG, Human Genome Project). În iulie 2000, conducătorii celor două grupuri au raportat descifrarea a peste 90% din genomul uman, iar în 2003, s-a raportat terminarea secvențializării întregului genom uman. Implicațiile asupra biochimiei, biologiei în general și asupra medicinei sunt enorme. De exemplu, au fost descoperite multe gene noi, ale căror funcții trebuiesc stabilite, s-au clarificat aspecte noi legate de evoluția umană, s-au stabilit căi noi de depistare a genelor implicate în apariția unor boli. Rezultatele acestui proiect vor avea efecte majore asupra unor discipline cum ar fi proteomul, bioinformatica, biotehnologia, sau farmacogenomica.

2. Apa și pH-ul

Apa este componenta predominantă a organismelor vii. Proprietățile sale unice, inclusiv abilitatea de a solvata o gamă largă de molecule organice și anorganice, derivă din structura dipolară a apei și din capacitatea de a forma legături de hidrogen. Felul în care apa interacționează cu o biomoleculă solvatată influențează structura amândurora. Fiind un agent nucleofil excelent, apa este reactant sau produs într-o multitudine de reacții. O mică parte din moleculele de apă disociază în ioni hidroxid și protoni, iar aciditatea soluțiilor apoase se raportează în general la scara logaritmică de pH. Ionii bicarbonat și alte substanțe tampon mențin pH-ul fluidului extracelular între 7.35 și 7.45. Perturbări ale echilibrului acido-bazic pot fi determinate prin măsurarea pH-ului în sângele arterial și a conținutului de CO_2 a sângelui venos. **Acidoza** (pH-ul sângelui < 7.35) poate fi cauzată de cetoza diabetică sau de acidoza lactică. **Alcaloza** (pH-ul sângelui > 7.45) poate apărea de exemplu după accesele de vomită. Reglarea echilibrului hidric se face prin: 1) mecanismele hipotalamice care reglează setea; 2) hormonul antidiuretic (ADH) care reglează retenția apei de către rinichi; 3) evaporarea la nivelul epidermei. Diabetul insipid, care constă în incapacitatea rinichiului de a concentra urina sau de a se adapta la schimbări mici ale osmolarității fluidului extracelular, apare ca urmare a incapacității osmoreceptorilor tubulari renali de a răspunde stimulilor ADH-ului.

2.1. Repartiția apei în organism

Organismul uman cuprinde circa 60% apă, care se repartizează în vasele sangvine și limfatice, în spațiile intercelulare și în celulele înseși. Există în mare două sectoare hidrice: **sectorul intracelular** și **sectorul extracelular**. Cele două sectoare hidrice sunt separate prin membrana celulară, a cărei **permeabilitate selectivă** determină deplasările apei și electroliților. Membrana celulară este permeabilă pentru K^+ și anionii mici și impermeabilă pentru Na^+ . Ca urmare, există o diferență remarcabilă între compoziția lichidelor extra- și intracelulare.

2.2. Rolurile apei în organism

Apa îndeplinește în organism roluri multiple și variate. În primul rând, ea are rol structural, intrând în compoziția diverselor geluri din organism. Acestea pot fi concepute ca rețele ale unor constituenți organici în ochiurile cărora circulă sau stagnează apa, care este reținută prin capilaritate. Pe de altă parte, apa există în spațiile libere dintre moleculele mari (în genere, proteice). O altă parte din apa structurală este unită cu moleculele proteice sau cu alte macromolecule, fiind reținută fizic la suprafața lor. Aceasta este apa legată, care poate fi comparată oarecum cu apa de hidratare a ionilor. În al doilea rând, apa alcătuiește mediul „interior” în care se distribuie toate substanțele solubile din organism, cu alte cuvinte, ea îndeplinește rolul de solvent natural al unui număr foarte mare de compuși anorganici și organici. Datorită acestei însușiri, apa transportă în organism atât substanțe nutritive și mediatorii controlului umoral, cât și produsele de excreție rezultate în urma diverselor procese metabolice.

Apa este un metabolit universal îndeplinind pe de o parte rol de reactant iar pe de altă parte rol de produs în numeroase și diverse reacții biochimice. Astfel, digestia alimentelor și dislocarea majorității constituenților organismului sunt reacții hidrolitice, deci la care apa participă ca reactant. Același rol de reactant îl îndeplinește apa și în reacțiile de oxido-reducere din organism care sunt de multe ori reacții de hidratare (fixare de apă) urmate de reacții de dehidrogenare. De asemenea, apa participă ca reactant la hidroliza ATP-ului (și a altor compuși macroergici), în urma cărora se eliberează energie. De altfel, mobilizarea energiei în organism presupune și formarea de apă la oxidarea hidrogenului în lanțul respirator; în acest caz apa este produs de reacție.

Alături de rolurile menționate, apa îndeplinește și rolul de aliment. De fapt, ea este alimentul indispensabil care asigură în organism desfășurarea normală a metabolismului tuturor celorlalte principii nutritive.

2.3. Unele proprietăți fizico-chimice ale apei

Punctul de topire și punctul de fierbere

Apa, H_2O , are o temperatură de topire (p. t.) și o temperatură de fierbere (p. f.) mult mai ridicată decât ale hidrurilor elementelor vecine din sistemul periodic. Apa este un lichid la temperatura obișnuită, în timp ce hidrurile elementelor vecine sunt gazoase.

	CH_4	NH_3	H_2O	HF
p. t.	- 184°C	- 78°C	0°C	- 83°C
p. f.	- 164°C	- 33°C	100°C	+ 19.5
	SiH_4	PH_3	H_2S	HCl
p. t.	- 185°C	- 133°C	- 85°C	- 115°C
p. f.	- 112°C	- 87°C	- 61°C	- 85°C

Înșușirea de a fi lichidă îi conferă apei rolul de mediu intern prin excelență.

Căldura specifică și căldura de vaporizare.

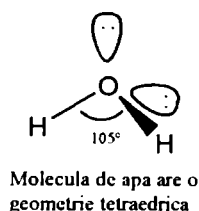
După amoniac, apa are cea mai mare căldură specifică (capacitate termică). Datorită faptului ca această căldură specifică este mare, apa poate primi sau ceda o cantitate apreciabilă de căldură, fără a-și schimba simțitor propria temperatură. Pentru un organism viu acest lucru este deosebit de important. Dacă în mediul intern nu ar fi apa care să înmagazineze o mare cantitate de căldură fără să își schimbe temperatura, căldura eliberată în numeroase reacții metabolice ar determina denaturarea multor

macromolecule celulare (proteine, acizi nucleici) contribuind astfel la modificarea structurii lor tridimensionale, ceea ce ar antrena pierderea unor funcții biologice importante.

Apa are și o căldură de vaporizare mare. Diverse calcule au arătat că evaporarea unui litru de apă prin piele și prin mucoasele căilor respiratorii face să se piardă 580 kcal din căldura corpului. Pe de altă parte, calculele au mai arătat că organismul omului adult pierde zilnic (fără a se ține seama de pierderile prin transpirație) cca 1200 ml apă, eliberând astfel 686 kcal (*perspiratio insensibilis*). Pierderile prin transpirație sunt și ele importante; în caz de efort, secreția sudorală poate crește până la 1600 ml/oră. Dacă această cantitate de apă se evaporă total, corpul pierde 900 kcal/oră. Se înțelege că în aceste condiții, supraîncălzirea corpului este preîntâmpinată datorită căldurii de vaporizare mari a apei, ceea ce contribuie la asigurarea desfășurării normale a proceselor biologice din organism.

Apa este un solvent biologic ideal

Polaritatea moleculei de apă. Molecula de apă (H_2O) este un tetraedru neregulat ușor turtit, în centrul căruia se află atomul de oxigen hibridizat sp^3 . Cei doi atomi de hidrogen și cele două perechi de electroni neparticipanți din doi orbitali sp^3 ai atomului de oxigen ocupă vârfurile tetraedrului. Unghiul dintre legăturile O-H (105°) diferă ușor de unghiul dintre legăturile C-H din metan, îndreptate către unghiurile unui tetraedru regulat ($109^\circ 28'$). (Molecula de amoniac este și ea un tetraedru în care unghiurile dintre legăturile N-H sunt 107°).



Molecula de apă este un **dipol**, adică o moleculă cu sarcina electrică distribuită asimetric. Atomul de oxigen, puternic electronegativ, atrage electronii de legătură, lăsând atomii de hidrogen parțial pozitiviți, în timp ce la atomul de oxigen densitatea electronică e mult mărită. Molecula de apă fiind un dipol puternic, apa are o constantă dielectrică mare. Potrivit legii lui Coulomb, forța de interacție F dintre particulele încărcate cu sarcini opuse este invers proporțională cu constanta dielectrică ϵ a mediului înconjurător. Constanta dielectrică pentru vid este 1 (unitate); pentru hexan 1,9; pentru etanol 24,3; iar pentru apă 78.5. Prin urmare apa scade forța de atracție între speciile polare sau ionice comparativ cu

solvenții cu constante dielectrice mai mici. Dipolul puternic și constanta dielectrică mare conferă apei capacitatea de a dizolva mari cantități de compuși încărcati electric, cum ar fi sărurile.

Moleculele de apă formează legături de hidrogen

Nucleul unui atom de hidrogen legat covalent de un element puternic electronegativ cu volum mic cum ar fi oxigenul sau azotul poate interacționa cu o pereche de electroni neparticipanți de la un alt atom de oxigen sau azot, formând o **legătură de hidrogen**. Molecula de apă poate funcționa atât ca donor cât și ca acceptor de hidrogen, apariția legăturilor de hidrogen favorizând asocierea moleculelor de apă. În medie, fiecare moleculă de apă în stare lichidă se asociază prin legături de hidrogen cu 3,5 alte molecule. Aceste legături sunt atât slabe cât și tranzitorii (timp de înjumătățire 1 μ s). Pentru a rupe o legătură de hidrogen este nevoie de 4,5 kcal/mol, cam 5% din energia necesară ruperii unei legături covalente O-H.

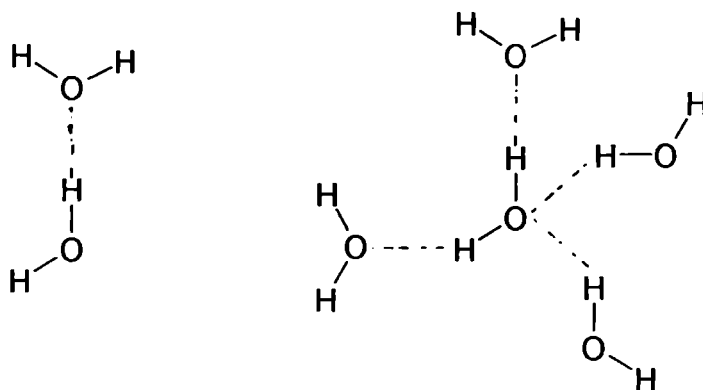


Figura 2.1. Reprezentarea unor legături de hidrogen între molecule de apă. *Stânga:* Asocierea a două molecule de apă prin legături de hidrogen (linie punctată). *Dreapta:* Grup de patru molecule de apă legate prin legături de hidrogen. O moleculă de apă poate servi atât ca donor cât și ca acceptor de hidrogen.

Asocierea prin numeroase legături de hidrogen explică apariția unor proprietăți fizice deosebite: apa are vâscozitatea, tensiunea superficială și punctul de fierbere anormal de ridicate.

Datorită capacității de a forma legături de hidrogen apa poate dizolva o serie de substanțe care conțin grupări funcționale care pot participa la formarea legăturilor de hidrogen. Atomii de oxigen din grupările carbonil (aldehyde, cetone, acizi, esteri, amide) pot furniza perechi de electroni neparticipanți, funcționând ca acceptori de hidrogen. Grupele hidroxi și amino pot servi atât ca acceptori cât și ca donori de hidrogen.

Interacțiunile cu moleculele de apă influențează structura biomoleculelor.

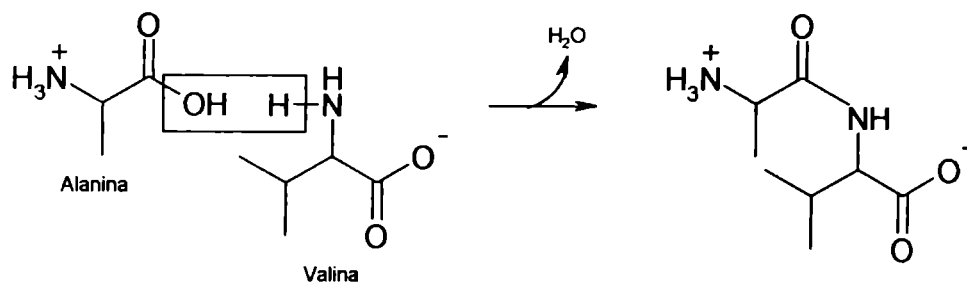
Forțele necovalente, deși mult mai slabe decât cele covalente, au o contribuție semnificativă la structura, stabilitatea și reactivitatea moleculelor din organismele vii. Aceste forțe, care pot fi atât de

atracție dar și de respingere, includ interacțiile dintre biomolecule, dar și dintre biomolecule și moleculele de apă, care reprezintă principalul component al mediului care înconjoară biomoleculele.

Biomoleculele se organizează în spațiu astfel încât să își expună grupările polare sau încărcate electric la suprafață. Majoritatea biomoleculelor sunt amfipatice; cu alte cuvinte, ele posedă regiuni hidrofile (cu grupări încărcate electric sau grupări polare), dar și regiuni cu caracter hidrofob. Proteinele de exemplu, au tendința de a se plia astfel încât grupările R hidrofobe ale amino acizilor componenți să fie orientate către interiorul moleculei proteice, pe când amino acizii cu grupări polare sau încărcate electric (lizina, arginina, aspartatul, glutamatul, serina) sunt orientați spre suprafața moleculei, care vine în contact cu apa. O organizare similară se observă și în cazul di-stratului fosfolipidic ce intră în alcătuirea biomembranelor: grupările încărcate electric ale fosfatidil-serinei sau fosfatidil-etanolaminei sunt părțile care vin în contact cu apa, în timp ce lanțurile hidrofobe de acil gras se aglutinează, excluzând apa din vicinitatea lor. Această organizare maximizează probabilitatea de formare a legăturilor favorizate din punct de vedere energetic (legături ion-dipol, dipol-dipol, de hidrogen) și reduce la minim contactele nefavorizate energetic dintre regiunile hidrofobe ale biomoleculelor și apă.

Apa este un excelent agent nucleofil. Molecula de apă, cu o încărcare electrică negativă parțială datorată celor două perechi de electroni neparticipanți de la atomul de oxigen constituie un agent nucleofil foarte bun. Alți agenți nucleofili cu importanță biologică sunt atomii de oxigen de la grupările fosfat, hidroxil, carboxil; atomii de sulf din grupările tiol; atomii de azot din grupările amino; inelul imidazolic din histidină, etc. Agenți electrofili în reacțiile biochimice pot fi: atomii de carbon carbonilici din amide, esteri, aldehide, cetone; atomul de fosfor din fosfoesteri, etc.

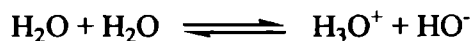
Atacul nucleofil al apei conduce de exemplu la scindarea prin **hidroliză** a diferite legături care intră în alcătuirea biopolimerilor: amidice, glicozidice, esterice, etc. În sens invers, când are loc formarea biopolimerilor, unitățile monomerice sunt condensate, iar apa este în acest caz produs de reacție.



În timp ce hidroliza este un proces favorizat termodinamic, legăturile amidice din peptide sau fosfoesterice din oligonucleotide sunt stabile în mediul apos intracelular. Acest paradox aparent este

explicat prin faptul că în organism toate reacțiile sunt catalizate enzimatic, astfel încât se pot desfășura reacții care altfel sunt total defavorizate termodinamic.

Moleculele apei au o slabă dar importantă tendință de disociere. Capacitatea moleculelor de a se ioniza, deși foarte redusă, este de o importanță majoră pentru procesele biochimice. Deoarece moleculele de apă pot juca rol atât de acid cât și de bază, ionizarea poate fi considerată ca un transfer intermolecular de un proton, cu formarea unui ion hidroniu (H_3O^+) și a unui ion hidroxid (HO^-):



Transferul protonic este de fapt asociat cu un număr mare de molecule de apă. Protonii nu există liberi, ci numai sub formă de H_3O^+ , dar și ca multimeri de tipul H_5O_2^+ sau H_7O_3^+ . De multe ori însă, protonul este reprezentat simplu H^+ , chiar dacă în realitate el este puternic hidratat.

Deoarece ionii de hidroniu și hidroxid se recombina continuu pentru a reforma moleculele de apă, ionii nu pot fi individualizați. Nu se poate vorbi de ioni sau molecule individuale, ci de *probabilitatea* ca un atom de hidrogen (oxigen) să fie la un moment dat parte dintr-un ion sau dintr-o moleculă. Deoarece numărul de molecule din – să zicem – un gram de apă este $3,46 \times 10^{22}$, ionizarea apei este un proces care poate fi descris statistic. Probabilitatea în apa pură ca un atom de hidrogen să fie sub formă ionică este aproximativ $1,8 \times 10^{-9}$. Cu alte cuvinte, în apa pură la fiecare ion de hidrogen (și implicit la fiecare ion hidroxid) există $1,8 \times 10^9$ molecule de apă neionizată. În ciuda acestei infime cantități, ionii de hidrogen și ionii hidroxid contribuie semnificativ la proprietățile apei. Constanta de disociere a apei K , este:

$$K = \frac{[\text{H}^+][\text{HO}^-]}{[\text{H}_2\text{O}]}$$

Deoarece concentrația apei nedisociată $[\text{H}_2\text{O}]$ este foarte mare, nu este practic afectată de disociere, așa că este considerată o constantă. Din această cauză, în locul constantei de disociere al apei K , se folosește o altă constantă K_w , numită **produsul ionic al apei**:

$$K_w = [\text{H}^+][\text{HO}^-] = 10^{-14} \text{ (moli/l)}^2$$

Valoarea de mai sus este cea corespunzătoare la temperatura de 25°C . La temperaturi mai mari decât 25°C , K_w are valori puțin mai mari. La temperaturi mai mici decât 25°C , K_w are valori puțin mai mici.

K_w este constant în toate soluțiile apoase, chiar și în soluțiile acide sau bazice [10^{-14} (moli/l)² la 25°C].

pH-ul este logaritmul negativ al concentrației ionilor de hidrogen. Termenul de pH a fost introdus de Sørensen ca logaritmul cu semn schimbat al concentrației ionilor de hidrogen.

$$\text{pH} = -\log [\text{H}^+]$$

De exemplu apa pură are:

$$\text{pH} = -\log [\text{H}^+] = -\log [\text{HO}^-] = -(-7) = 7$$

Valori mici ale pH-ului corespund unor concentrații mari de $[\text{H}^+]$, iar valori mari ale pH-ului corespund unor concentrații mici de $[\text{H}^+]$. Acizii sunt **donori de protoni**, iar bazele sunt **acceptoare de protoni**. **Acizii tari** (HCl , H_2SO_4) disociază complet în soluții apoase (creând un pH mic), pe când **acizii slabi** disociază numai parțial. În mod similar, **bazele tari** (KOH , NaOH) disociază complet în soluții apoase (creând un pH mare), pe când **bazele slabe** disociază numai parțial. Acizii și bazele întâlnite în reacțiile biochimice sunt slabe. Excepție fac intermediarii fosforilați, a căror grupare fosforil conține doi protoni disociabili, dintre care primul este puternic acid.

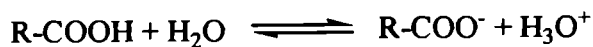
Grupările funcționale cu caracter slab acid au mare importanță fiziologică. O serie de biomolecule posedă grupări funcționale cu slab caracter acid sau bazic. Grupările carboxil, amino, fosfat, sunt prezente în proteine, acizi nucleici, precum și în majoritatea coenzimelor sau a diferiților metaboliți. Disocierea acestor grupări slab acide sau bazice are o mare influență asupra pH-ului intracelular ca și asupra structurii și activității biologice a diversilor compuși biochimici. Tehnici de separare ca electroforeza, cromatografia cu schimbători de ioni, etc. se folosesc de asemenea în funcție de comportamentul acido-bazic al unor astfel de grupări funcționale.

O specie protonată (HA , R-NH_3^+) se numește **acid**, iar specia neprotonată corespunzătoare, **bază conjugată**. Similar, avem **bază** (A^- , R-NH_2) și **acid conjugat** (HA , R-NH_3^+). Câțiva acizi slabi și bazele lor conjugate sunt prezentat în tabelul de mai jos:

Tabelul 2.1. Acizi slabi și bazele lor conjugate

pK _a	bază conjugată	acid
4-5	$\text{R-CH}_2\text{-COO}^-$	$\text{R-CH}_2\text{-COOH}$
9-10	$\text{R-CH}_2\text{-NH}_2$	$\text{R-CH}_2\text{-NH}_3^+$
6,4	HCO_3^-	H_2CO_3
7,2	HPO_4^{2-}	H_2PO_4^-

Tăria unui acid este dată de constanta sa de disociere, K_a . Pentru un acid carboxilic $R-COOH$,



$$K_a = \frac{[R-COO^-][H^+]}{[R-COOH]}$$

Cu cât un acid este mai tare, cu atât constanta sa de disociere va fi mai mare. Pentru exprimarea tăriei unui acid se poate folosi pK_a , care reprezintă logaritmul cu semn schimbat al constantei de disociere.

$$pK_a = -\log K_a$$

Cu cât un acid este mai tare, cu atât pK_a -ul său va fi mai mic. pK_a este utilizat pentru exprimarea tăriei atât a acizilor, cât și a bazelor. Deoarece unui acid slab, îi corespunde o bază conjugată tare, și invers, tăria bazelor poate fi exprimată în termeni de pK_a al acidului său conjugat.

Tabelul 2.2. Tăria unor acizi cu importanță biologică.

Acizi monoprotici		
formic	pK_a	3,75
lactic	pK_a	3,86
acetic	pK_a	4,76
ion amoniu	pK_a	9,25
Acizi diprotici		
carbonic	pK_{a1}	6,37
	pK_{a2}	10,25
succinic	pK_{a1}	4,21
	pK_{a2}	5,64
glutamic	pK_{a1}	4,34
	pK_{a2}	5,41
Acizi triprotici		
fosforic	pK_{a1}	2,15
	pK_{a2}	6,82
	pK_{a3}	12,38
citric	pK_{a1}	3,08
	pK_{a2}	4,74
	pK_{a3}	5,40

Tăria unui acid depinde de structura sa moleculară. Mulți dintre acizii cu interes biologic au mai mult de o singură grupare dissociabilă. Prezența unei grupări negative în vecinătate micșorează mobilitatea protonului de la gruparea acidă, ridicând pK_a -ul. Acest lucru se poate vedea de exemplu în cazul celor trei grupări dissociabile ale acidului fosforic sau ale acidului citric (Tabelul 2. 2). Efectul unei grupări asupra acidității scade cu distanța. În cazul acidului succinic pK_2 corespunzător celei de a doua grupări carboxil este 5,6, în timp ce pentru acidul glutamic, care are o grupare CH_2 în plus, pK_2 este 5,4.

Valoarea pK_a este puternic influențată și de proprietățile mediului adiacent grupării acide. Astfel, mediul înconjurător poate fie să ridice, fie să coboare valoarea pK_a , în funcție de natura sa. De exemplu, efectul constantei dielectrice asupra pK_a poate fi observată prin adăugarea la o soluție apoasă de acid sau bază a unei cantități oarecare de etanol. Prezența în soluție a etanolului determină creșterea pK_a -ului unui acid carboxilic și scăderea pK_a -ului unei amine, datorită faptului că etanolul scade capacitatea apei de a solvata grupările încărcate electric. Astfel, valorile pK_a ale grupărilor dissociabile din interiorul unei proteine sunt puternic influențate de caracteristicile locale, inclusiv de prezența sau absența apei din zona respectivă.

3. Proteine, Peptide și Aminoacizi

Proteinele reprezintă – după apă – constituenții cei mai importanți ai organismelor vegetale și animale. În aceste organisme, proteinele îndeplinesc roluri multiple și variate: intră în structura celulelor din diverse țesuturi și organe, sunt constituenți principali ai enzimelor, au rol în apărare, sunt hormoni ce intervin în reglarea proceselor metabolice.

Indiferent de originea lor, de specia de la care provin, proteinele sunt constituite din 20 **aminoacizi** deosebiți structural unii de alții, ceea ce conferă proteinelor o diversitate și o complexitate extraordinară. Deoarece numeroase proprietăți ale proteinelor se datoresc faptului că sunt constituite din aminoacizi, este necesară în prealabil prezentarea aminoacizilor care intră în constituția lor, precum și unele proprietăți ale acestora.

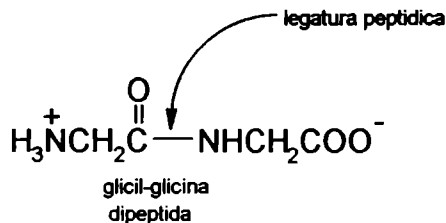
În afara faptului că reprezintă unitățile funcționale ale lanțurilor polipeptidice și proteice, L-α-aminoacizii și derivații lor participă la desfășurarea unor funcții biologice diverse, cum ar fi transmiterea impulsului nervos, biosinteza porfirinelor, purinelor, pirimidinelor, ureei, etc. Polimeri mici ai aminoacizilor numiți **peptide** joacă roluri importante în sistemul neuro-endocrin, acționând ca hormoni, regulatori ai secreției hormonale, neuromodulatori, neurotransmițători. În timp ce proteinele conțin numai L-α-aminoacizi, microorganismele pot sintetiza peptide care conțin atât L-α- cât și D-α-aminoacizi. Unele dintre aceste polipeptide au o valoare terapeutică acționând ca antibiotice (bacitracina, gramicidina S) sau ca agenți antitumorali (bleomicină). Alte peptide microbiene pot fi toxice. De exemplu microcistina și nodularina, peptide secretate de cianobacterii, sunt letale în doze mari, în timp ce în doze mici induc apariția unor tumori hepatice. Oamenii și organismele superioare sunt incapabile să sintetizeze în cantități suficiente pentru funcționarea normală a organismului 10 din cei 20 L-α-aminoacizi, astfel încât este important ca hrana să conțină cantități suficiente din acești aminoacizi esențiali.

3.1. Aminoacizii

Aminoacizii reprezintă o clasă de compuși difuncționali cu o semnificație biologică deosebită, datorită faptului că ei sunt unitățile de bază care intră în alcătuirea proteinelor. Deoarece cele două grupări funcționale dintr-un aminoacid sunt una cu caracter acid și cealaltă cu caracter bazic, acești compuși sunt **amfoteri**, iar molecula lor există preponderent sub formă desare internă sau **amfion** (**zwitterion**). De exemplu glicina, cel mai simplu aminoacid se prezintă mai curând ca afion decât ca specie neionizată.



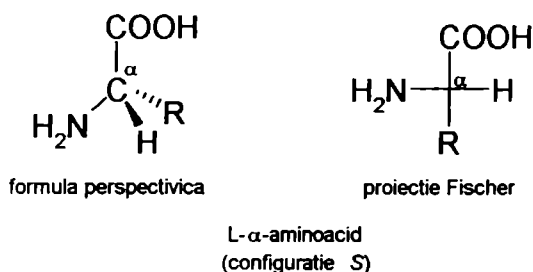
Aminoacizii datorează importanța lor specială din natură faptului că au capacitatea de a forma o legătură amidică între două molecule de aminoacid. O astfel de legătură se numește **legătură peptidică**, iar compușii rezultați se numesc **peptide**.



În funcție de numărul aminoacizilor componenți putem întâlni **di-, tri-, tetra-...**, **oligopeptide**. Pe măsură ce numărul aminoacizilor componenți crește, se obțin polimeri care alcătuiesc clasa **polipeptide**. **Proteinele** sunt polipeptide care conțin mai mult de 50 aminoacizi per moleculă.

3.1.1. Aminoacizi care intră în constituția proteinelor

Prin hidroliza acidă, bazică sau enzimatică a proteinelor, rezultă **α -aminoacizi**, care reprezintă unitățile chimice de bază ale macromoleculelor proteice.

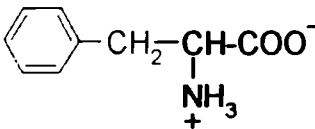
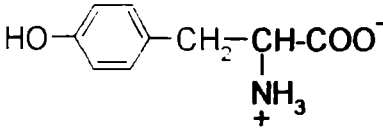
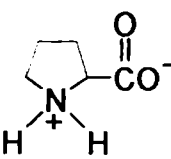
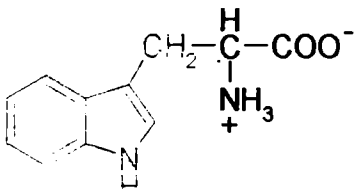


Din cei peste 300 aminoacizi naturali, numai 20 sunt cei care intră în alcătuirea proteinelor, acest lucru fiind determinat prin codul genetic, care este universal pentru toate viețuitoarele. Structura celor 20 aminoacizi este prezentată în Tabelul 3.1., împreună cu abrevierile acceptate în mod convențional (de trei litere și de o literă). Ambele tipuri de abrevieri pot fi utilizate pentru a reprezenta succesiunea aminoacizilor în peptide și proteine.

Tabelul 3.1. α -Aminoacizi naturali care intră în alcătuirea proteinelor. Structurile prezentate sunt cele care predomină la pH-ul fiziologic (pH=7,3).

Nume	Simbol	Formulă structurală	pK _{a1} (α -COOH)	pK _{a2} (α -NH ₂)	pK _{a3} (R)	Abundența medie în structura proteinelor
Aminoacizi cu lanț alifatic monoamino monocarboxilici						
Glicină	Gly (G)	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{COO}^- \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$	2,4	9,8		7,5%
Alanină	Ala (A)	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{CH}_3-\text{C}-\text{COO}^- \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$	2,4	9,9		9.0%
Valină*	Val (V)	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{CH}_3\text{CH}-\text{C}-\text{COO}^- \\ \quad \\ \text{CH}_3 \text{NH}_3^+ \end{array}$	2,2	9,7		6.9%
Leucină*	Leu (L)	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{CH}_3\text{CHCH}_2-\text{C}-\text{COO}^- \\ \quad \\ \text{CH} \text{NH}_3^+ \end{array}$	2,3	9,7		7.5%
Izoleucină*	Ile (I)	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}-\text{C}-\text{COO}^- \\ \quad \\ \text{CH}_3 \text{NH}_3^+ \end{array}$	2,3	9,8		4.6%
Aminoacizi cu grupări hidroxil (OH)						
Serină	Ser (S)	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{HO}-\text{C}-\text{COO}^- \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$	2,2	9,2	≈ 13	7.1%
Treonină*	Thr (T)	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{HO}-\text{CH}-\text{C}-\text{COO}^- \\ \quad \\ \text{CH} \text{NH}_3^+ \end{array}$	9,2	9,1	≈ 13	6.0%
Tirozină*		Vezi mai jos				

Aminoacizi cu sulf						
Cisteină	Cys (C)	$\text{HSCH}_2-\underset{\substack{\text{NH}_3^+}}{\overset{\text{H}}{\text{C}}}-\text{COO}^-$	1,9	10,8	8,3	2.8%
Metionină*	Met (M)	$\text{CH}_3\text{SCH}_2\text{CH}_2-\underset{\substack{\text{NH}_3^+}}{\overset{\text{H}}{\text{C}}}-\text{COO}^-$	2,1	9,3		1.7%
Aminoacizi monoaminodicarboxilici și amidele lor						
Aspartat acid aspartic	Asp (D)	$^-\text{OOCCH}_2-\underset{\substack{\text{NH}_3^+}}{\overset{\text{H}}{\text{C}}}-\text{COO}^-$	2,0	9,9	3,9	5.5%
Glutamat acid glutamic	Glu (E)	$^-\text{OOCCH}_2\text{CH}_2-\underset{\substack{\text{NH}_3^+}}{\overset{\text{H}}{\text{C}}}-\text{COO}^-$	2,1	9,5	4,1	6.2%
Asparagină	Asn (N)	$\text{H}_2\text{N}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{CH}_2-\underset{\substack{\text{NH}_3^+}}{\overset{\text{H}}{\text{C}}}-\text{COO}^-$	2,1	8,8		4.4%
Glutamină	Gln (Q)	$\text{H}_2\text{N}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\underset{\substack{\text{NH}_3^+}}{\overset{\text{H}}{\text{C}}}-\text{COO}^-$	2,2	9,1		3.9%
Aminoacizi cu grupări bazice						
Lizină*	Lys (K)	$\text{H}_2\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\underset{\substack{\text{NH}_3^+}}{\overset{\text{H}}{\text{C}}}-\text{COO}^-$	2,2	9,2	10,8	7.0%
Arginină*	Arg (R)	$\text{H}_2\text{N}^+\text{C}(\text{NH}_2)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\underset{\substack{\text{NH}_3^+}}{\overset{\text{H}}{\text{C}}}-\text{COO}^-$	1,8	9,0	12,5	4.7%
Histidină*	His (H)	$\text{C}_6\text{H}_4=\text{CH}-\underset{\substack{\text{NH}_3^+}}{\overset{\text{H}}{\text{C}}}-\text{COO}^-$	1,8	9,3	6,0	2,1

Aminoacizi cu resturi fenil						
Fenilalanină*	Phe (F)		2,2	9,2		3,5%
Tirozină	Tyr (Y)		2,2	9,1	10,1	3,5%
Aminoacizi heterociclici						
Histidină*	His	Vezi mai sus				
Prolină	Pro (P)		2,0	10,6		4,6
Triptofan*	Trp (W)		2,4	9,4		1,1

*Aminoacizi esențiali

Aminoacizii naturali care intră în compoziția proteinelor diferă doar prin substituentul R atașat la carbonul α . Marea varietate a acestor substituenți laterali este ceea ce conferă proteinelor diversitatea lor structurală și în consecință marea lor diversitate funcțională. **Codul genetic specifică 20 L- α -aminoacizi care intră în constituția proteinelor.** Unele proteine conțin și alți aminoacizi care apar datorită modificării biochimice a unui aminoacid deja prezent în proteină. Astfel de transformări includ conversia unei peptidil-lizine sau peptidil proline în peptidil-hidroxilizină și respectiv peptidil-hidroxiprolină, metilarea, formilarea, acetilarea, fosforilarea, etc. a diverselor resturi aminoacil. Astfel de modificări măresc gradul de complexitate al proteinelor producând modificări ale solubilității, stabilității, ca și asupra interacțiilor cu alte proteine.

Toți cei 20 de aminoacizi au o serie de caracteristici structurale comune:

- au o grupare amino în poziție α , cu excepția prolinei, care conține o grupare imino, membră a unui ciclu pirolidonic;

- cu o singură excepție, glicocolul, toți aminoacizii au atomul de carbon α chiral (centru de chiralitate), având deci activitate optică;
- atomul de carbon α are configurație *S*; în proiecție Fischer gruparea NH_2 este orientată spre stânga, deci aminoacizii naturali sunt L- α -aminoacizi;
- prezența simultană a celor două grupări, carboxilică și amino, învecinate spațial, face posibilă formarea legăturii peptidice, legătură cu mare importanță biologică.

Cu excepția glicinei, atomul de carbon din poziția α este chiral, deci unii aminoacizi sunt dextrogiri iar alții sunt levogiri. Toți au aceeași configurație cu L-glicerinaldehida, deci fac parte din seria L. Există un număr de α -aminoacizi liberi cu roluri importante în procesele metabolice. De exemplu ornitina, citrulina și argininosuccinatul participă la sinteza ureei; tirozina ia parte la formarea hormonilor tiroidieni; glutamatul este implicat în biosinteza unor substanțe neurotransmițătoare. Există și D-aminoacizi care se întâlnesc în natură: D-serina și D-aspartatul se găsesc în țesutul cerebral; D-alanina și D-glutamatul se găsesc în pereții celulari ai bacteriilor gram-negative, etc.

3.1.2. Aminoacizi care nu intră în constituția proteinelor

În afara celor 20 aminoacizi care intră în structura proteinelor, în natură există o serie de aminoacizi care sunt constituenți ai altor biomolecule sau produși intermediari în diferite procese biochimice.

Tabelul 3.2. Aminoacizi neproteinogenici

Formulă	Denumire	Rol biologic
$\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COOH}$	β -alanină	componentă a dipeptidelor carnozină și anserină, a acidului pantotenic și coenzimei A
$\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_3-\text{COOH}$	Acid γ -aminobutiric (GABA)	transmiterea impulsului nervos; agent de blocare a sinapselor
$\text{H}_3\text{C}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{COOH}$	sarcozină	utilizată în tratamentul cancerului
$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{C}-\text{COO}^- \\ \\ \text{N}^+(\text{CH}_3)_3 \end{array}$	betaină	rol lipolitic
$\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{SO}_3\text{H}$	taurină	componentă a acizilor biliari

$\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_3-\overset{\text{H}}{\underset{\text{NH}_2}{\text{C}}}-\text{COOH}$	ornitină	intermediar al cilului ureogenetic
$\text{H}_2\text{N}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{HN}-(\text{CH}_2)_3-\overset{\text{H}}{\underset{\text{NH}_2}{\text{C}}}-\text{COOH}$	citrulină	intermediar al cilului ureogenetic

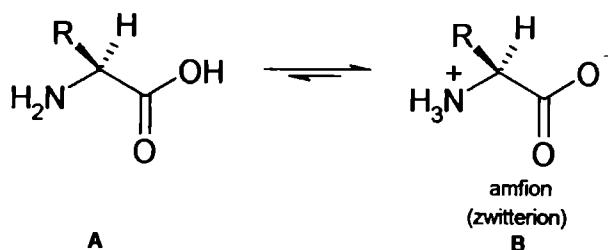
3.1.3. Proprietățile aminoacizilor

Grupările $-\text{COOH}$ și cea $-\text{NH}_2$ pot exista atât în forma neutră, cât și în formă ionizată.

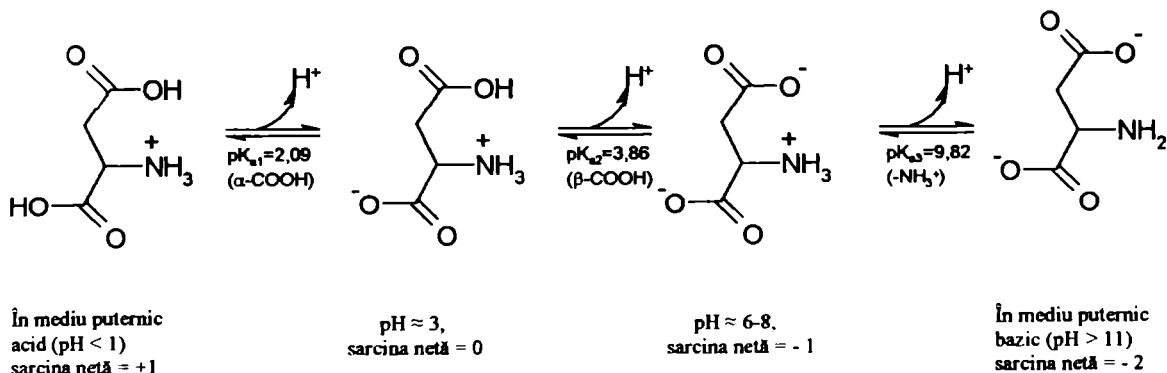


Aminoacizii pot fi încărcăți pozitiv, negativ, sau pot avea sarcina netă zero. Deși ambele grupări R-COOH și R-NH_3^+ sunt slab acide, R-COOH este mult mai tare decât R-NH_3^+ . La pH-ul fiziologic ($\text{pH} = 7,3-7,4$) grupările carboxil se găsesc preponderent în stare ionizată R-COO^- , iar grupările amino predominant ca R-NH_3^+ .

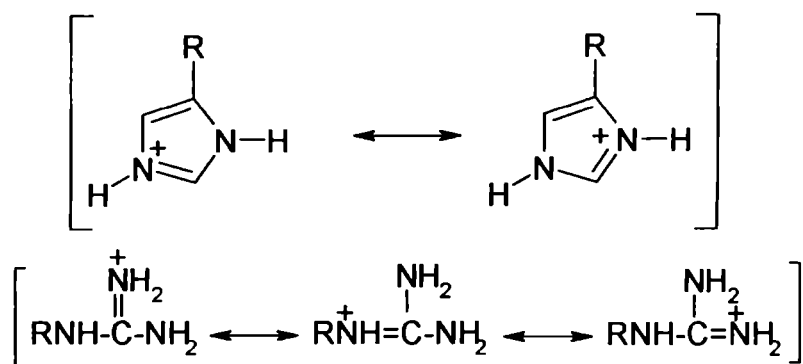
Moleculele care conțin un număr egal de grupări ionizabile cu sarcini opuse se numesc **amfioni** sau **zwitterioni**.



Aminoacizii din fluidele biologice (sânge, majoritatea țesuturilor) trebuie scriși ca amfioni. Structura **B** nu poate exista într-o soluție apoasă deoarece la orice pH suficient de mic pentru a protona gruparea carboxil, gruparea amino va fi și ea protonată. Analog, al un pH suficient de mare pentru ca gruparea amino neprotonată să predomine, gruparea carboxil va dona și ea un proton, transformându-se în carboxilat, $-\text{COO}^-$. Formula **B** se folosește însă de multe ori atunci când reacțiile nu implică echilibre acido-bazice. Mai jos este prezentat efectul pH-ului asupra gradului de încărcare electrică a acidului aspartic.



Tăria aminoacizilor este exprimată de indicele pK_a (Tabelul 3.1). Gruparea imidazol din histidină și gruparea guanidino din arginină există sub forma unor hibrizi de rezonanță cu sarcina pozitivă distribuită între cei doi atomi de azot (histidină) sau cei trei atomi de azot (arginină).



O specie moleculară care are un număr egal de sarcini pozitive și negative este neutră din punct de vedere electric (formă **izoelectrică**). Valoarea pH -ului la care moleculele de aminoacid sunt au suma de sarcini negative egală cu suma sarcinilor pozitive este cunoscut ca **pH -ul izoelectric (pI)** al aminoacidului respectiv. **La pH -ul izoelectric, sarcina netă a unui aminoacid este zero.** În cazul unui aminoacid monoamino monocarboxilic,

$$\text{pI} = \frac{\text{pK}_{a1} + \text{pK}_{a2}}{2}$$

De exemplu, pI pentru alanină este:

$$\text{pI} = \frac{2,35 + 9,69}{2} = 6,02$$

Pentru acizii polifuncționali, pI este tot o medie între pK_a-urile aflate de o parte și de alta a pI-ului. De exemplu, pI pentru acidul aspartic este:

$$pI = \frac{pK_{a1} + pK_{a2}}{2} = \frac{2,09 + 3,96}{2} = 3,02$$

iar pentru lizină,

$$pI = \frac{pK_{a2} + pK_{a3}}{2} = \frac{9,2 + 10,8}{2} = 10$$

Calculule similare se folosesc și pentru acizii poliprotici (de exemplu proteinele), indiferent de numărul grupărilor dissociabile prezente. În laboratorul clinic, cunoașterea pI-ului este necesară pentru selecția condițiilor necesare separării electroforetice. De exemplu, electroforeza la pH = 7 va separa două molecule cu pI = 6 și pI = 8 deoarece la pH = 7 molecula cu pI = 6 va fi încărcată pozitiv, iar molecula cu pI = 8 va fi încărcată negativ.

Valoarea pK_a a unei grupări dissociabile este un parametru care depinde de natura mediului care înconjoară gruparea respectivă. Vecinătatea unei grupări dissociabile poate influența pK_a-ul grupării. Valorile pK_a ale grupărilor R (prezentate în Tabelul 3.1) reprezintă valori determinate în soluții apoase pure ale aminoacizilor respectivi. Aceste valori ne dau doar o idee asupra valorilor pK_a ale acelorași aminoacizi când sunt prezenți într-o proteină. Un mediu polar favorizează o formă încărcată electric (R-COO⁻ sau R-NH₃⁺), pe când un mediu nepolar favorizează apariția formelor neîncărcate electric (R-COOH și R-NH₂). Așadar, un mediu nepolar *mărește* valoarea pK_a grupării carboxil (făcând-o un acid mai slab) dar în același timp *scade* pK_a-ul unei grupări amino (făcând-o un acid mai tare). Existența unor grupări adiacente încărcate electric poate să accentueze sau să diminueze efectele solventului. Prin urmare, pK_a-ul unei grupări funcționale este dependent de poziția sa în molecula de proteină. În funcție de vecinătățile unei grupări, pK_a-ul său se poate schimba chiar cu câteva unități de pH. Diferențe de 2-3 unități de pH față de valorile pK_a prezentate în Tabelul 3.1. sunt frecvente în special în situsurile active ale enzimelor. Ca un exemplu extrem, un reziduu de acid aspartic „îngropat” în structura unei enzime numită tioredoxină are pK_a > 9, observându-se un salt mai mare de 6 unități de pH.

Solubilitatea și punctul de topire al aminoacizilor: dovadă a caracterului lor ionic. Prezența grupărilor încărcate electric în structura lor face ca aminoacizii să fie solubili în solvenți polari (apă, etanol), dar insolubili în solvenți nepolari (benzen, hexan, eter). Aminoacizii sunt substanțe

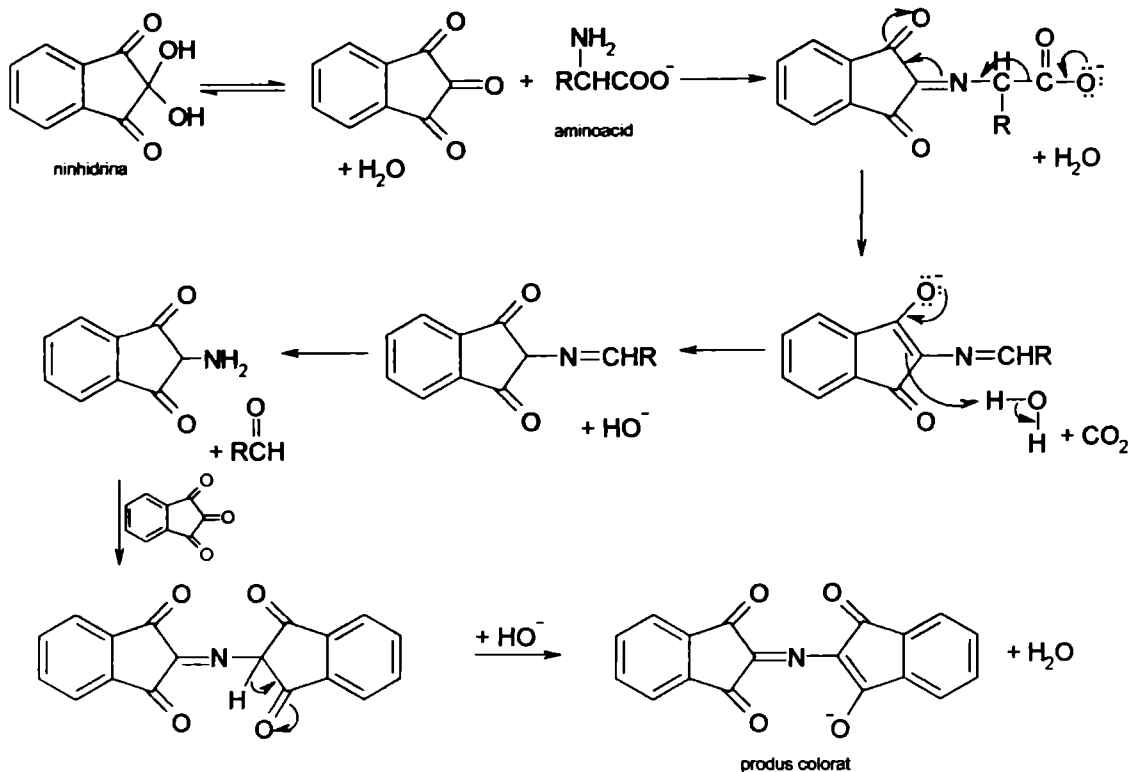
solide, albe, cristalizate. Anumiți aminoacizi sunt mai greu solubili în apă (tirozina, cisteina). Datorită acestei insolubilități, cisteina în anumite condiții formează o calculoză renală – **cisteinuria**.

Aminoacizii nu absorb în domeniul vizibil, așa încât sunt substanțe incolor. Tirozina, fenilalanina și mai ales triptofanul prezintă un maxim de absorbție în UV (250-290 nm), prin urmare prezența triptofanului în structura unei proteine îi conferă acesteia proprietatea de a absorbi lumina ultravioletă în jurul valorii de 280 nm.

Grupările α -R unt importante pentru proprietățile unui aminoacid. De multe ori glicina, cel mai mic aminoacid ($R = H$), este găsit în locurile unde lanțul proteic se îndoaie puternic, deoarece ea poate pătrunde în locurile inaccesibile celorlalți aminoacizi. Grupările R hidrofobe din fenilalanină, tirozină și triptofan se găsesc în special spre interiorul proteinelor citosolice. Grupările R încărcate electric din aminoacizii cu caracter bazic sau acid stabilizează conformația unei molecule proteice prin intermediul legăturilor ionice. Astfel de grupări funcționează ca „stafete de sarcină” în timpul catalizei enzimatică. Histidina, de exemplu, joacă un rol unic în cataliza enzimatică, datorită pK_a -ului protonului imidazolic care îi permite să funcționeze la pH-ul fiziologic atât ca acid cât și ca bază. Grupările $-OH$ din serină sau $-SH$ din cisteină sunt buni agenți nucleofili și pot funcționa ca atare în cataliza enzimatică. În același timp, gruparea $-OH$ (alcool secundar) din treonină, deși un bun nucleofil, nu se bucură de aceeași importanță în cataliza enzimatică. Grupările $-OH$ din serină, treonină și tirozină pot participa la reglarea activității unor enzime a căror activitate enzimatică depinde de gradul de fosforilare a acestor grupări.

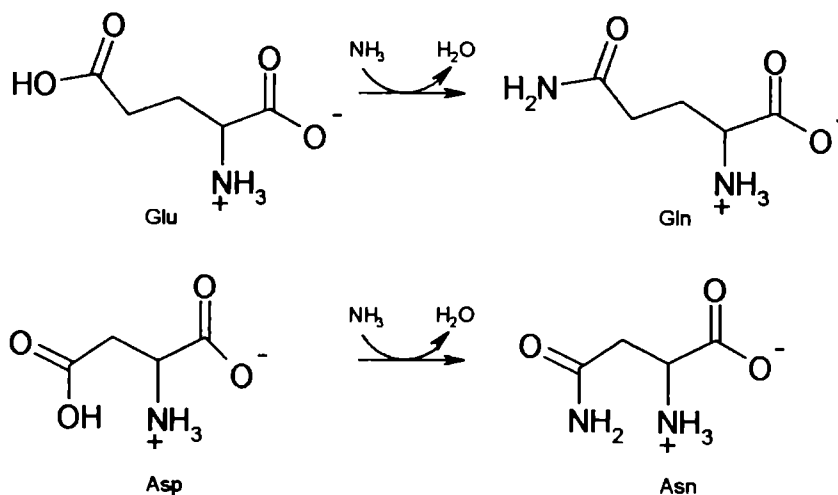
Grupările funcționale determină reactivitatea chimică a aminoacizilor. Grupările funcționale ale aminoacizilor prezintă majoritatea reacțiilor caracteristice grupării respective. Astfel, gruparea carboxil din aminoacizi se poate esterifica, poate forma amide, anhidride, cloruri acide, azide; grupările amino se pot acila, grupările $-OH$ și $-SH$ se pot oxida, esterifica, etc.

Aminoacizii dau o reacție de culoare cu ninhidrina, reacție des utilizată pentru detectarea și cuantificarea aminoacizilor. Ninhidrina formează un produs purpuriu cu gruparea α -amino din α -aminoacizi și un produs galben cu gruparea imino din prolină și hidroxiprolină. În urma reacției cu ninhidrina, numai azotul grupării amino apare în produsul final.

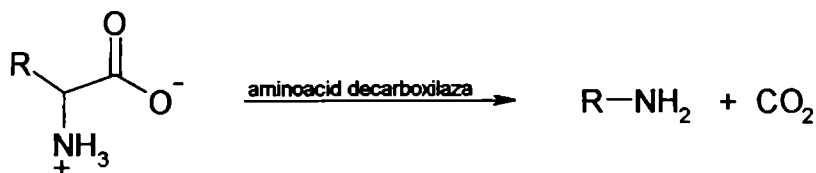


Reacții ale grupării carboxil cu importanță biologică

Formarea de amide constituie un proces de mare importanță biologică, având loc în mod continuu în organism.

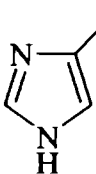


α -Aminoacizii se pot decarboxila, formând aminele respective. Reacțiile de decarboxilare a aminoacizilor sunt catalizate de enzime numite aminoacid decarboxilaze care aparțin clasei liazelor și folosesc drept coenzimă piridoxal fosfatul.



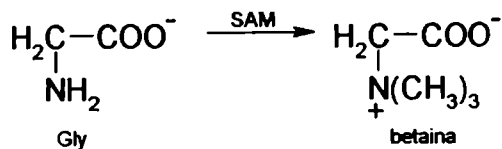
Multe amine produse în organism prin decarboxilarea aminoacizilor au acțiuni remarcabile, sau sunt intermediari în diverse reacții metabolice.

Tabelul 3.3. Exemple de amine biogene formate prin decarboxilarea aminoacizilor în organism

Aminoacidul de origine	Denumirea aminei	Formulă	Rol biologic
Glu	acid γ -aminoglutaric	$\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}_2$	mediator chimic; transmiterea impulsului nervos
Cys	cisteamină	$\text{HS}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2$	component al coenzimei A
Ser	etanolamină	$\text{HO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2$	component al fosfolipidelor
Lys	cadaverină	$\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_5-\text{NH}_2$	diamină toxică
Tyr	tiramină	$\text{HO}-\text{C}_6\text{H}_4-(\text{CH}_2)_2-\text{NH}_2$	hipertensiv, contracția uterului
His	histamină	 $\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2$	mediator chimic; transmiterea impulsului nervos

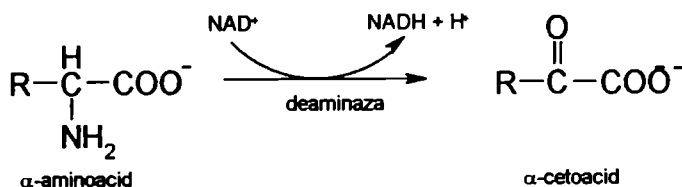
Reacții ale grupării amino

Alchilarea aminoacizilor poate avea loc *in vitro* în prezența iodurii sau sulfatului de metil, sau poate avea loc *in vivo* sub acțiunea unei substanțe specializate pentru această reacție: metionina activată sau S-adenozil-metionina (SAM).

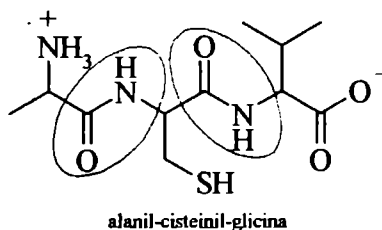


Betaina se administrează în cazurile de insuficiență hepatică.

Dezaminarea este o reacție prin care aminoacizii se transformă în cetoacizi, intermediari metabolici de mare importanță.



Cea mai importantă reacție a aminoacizilor o constituie **formarea legăturii peptidice** (legăturile încercuite).



3.1.4. Aminoacizi esențiali

Biosinteza proteinelor specifice unui organism este direct corelată cu aportul de aminoacizi exogeni proveniți din alimentație. Sinteza tuturor celor 20 α -aminoacizi ce intră în constituția proteinelor nu poate fi făcută în totalitate decât de plante și microorganisme. În cursul evoluției, organismele umane și animale au pierdut capacitatea de a sintetiza 8 aminoacizi, pe care nu îi pot obține decât prin aport exogen din proteinele de natură vegetală sau microbiană.

Aminoacizii care sunt absolut necesari pentru creșterea și dezvoltarea organismelor umane și animale și care sunt furnizați prin alimentație se numesc aminoacizi **esențiali** (indispensabili, vezi Tabelul 3.1). Lipsa acestor aminoacizi din alimentație provoacă tulburări foarte grave.

Doi aminoacizi, histidina și arginina, sunt indispensabili organismelor în creștere, sinteza lor endogenă nefiind suficientă pentru a acoperi nevoile mai mari din perioadele de creștere (aminoacizi **semiesențiali**). Ceilalți aminoacizi pot fi sintetizați în organism printr-o serie de reacții care au ca

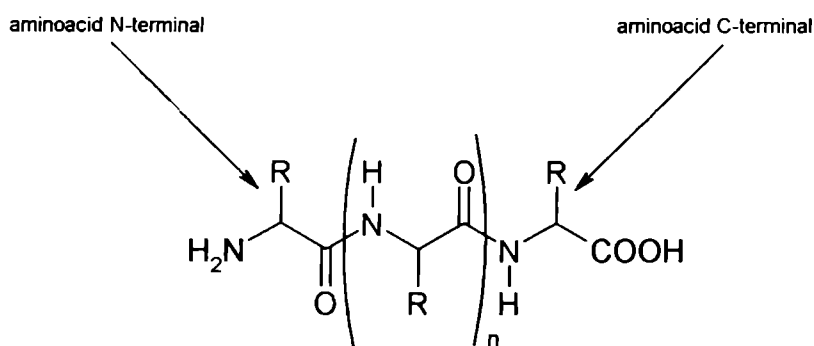
puncte de plecare diverși metaboliți; ei sunt aminoacizi **neesențiali** (dispensabili) și prin urmare pot lipsi din hrană. Carența în anumiți aminoacizi prin aport alimentar insuficient se manifestă printr-o simptomatologie complexă, ca de exemplu:

- carența în lizină: determină încetinirea creșterii;
- carența în triptofan: determină tulburări vasculare și modificarea tabloului leucocitar;
- carența în tirozină: determină atrofierea tiroidei și hipofizei;
- carența în tioaminoacizi: determină atrofierea testiculelor, degradarea ovarelor și sterilitate.

3.2. Peptide

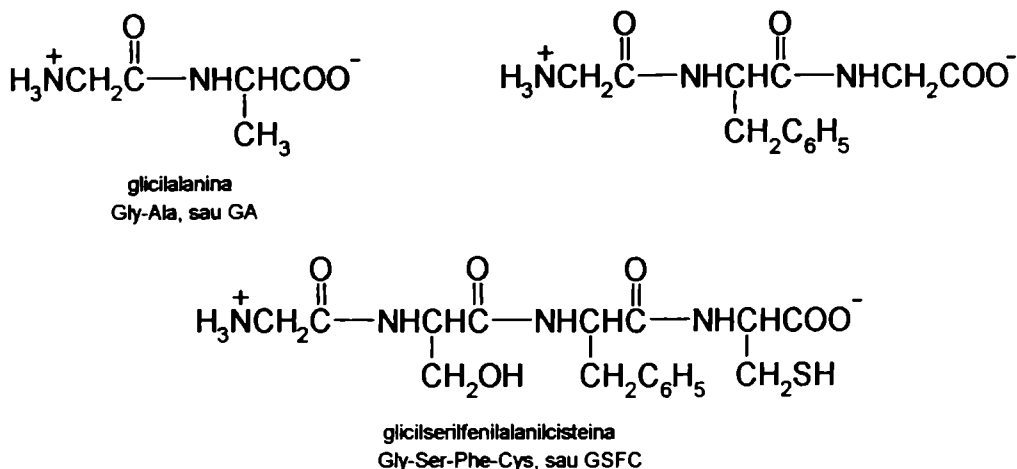
3.2.1. Clasificarea și nomenclatura peptidelor.

Peptidele sunt substanțe naturale sau sintetice constituite dintr-un număr restrâns (2-50) de aminoacizi care se obțin formal prin condensarea intermoleculară a unei grupări carboxil de la un aminoacid cu gruparea amino de la aminoacidul următor. Peptidele reprezintă compuși intermediari între aminoacizi și proteine. Peptidele alcătuite din 2-10 aminoacizi se definesc ca **oligopeptide** (di-, tri-, tetra-, etc.). Peptidele alcătuite din 10-50 aminoacizi se definesc ca **polipeptide**. Ca origine, peptidele prezente în organismul uman pot proveni fie din aminoacizi, prin biosinteză, fie ca produși intermediari în procesele biochimice de degradare și biosinteză a proteinelor. Cu excepția peptidelor ciclice, o polipeptidă conține o grupare -NH_2 liberă (capătul N-terminal) și o grupare carboxil liberă (capătul C-terminal).



Prin convenție, structura unei peptide este prezentată cu aminoacidul N-terminal în stânga și cu aminoacidul C-terminal în dreapta. Pentru a denumi o peptidă se specifică în ordinea de succesiune - începând cu aminoacidul N-terminal – numele radicalilor aminoacizilor, iar la sfârșit se adaugă numele

întreg al aminoacidului C-terminal. Deoarece denumirile devin complicate, de multe ori se preferă abrevierile prezentate în Tabelul 3.1.



Dacă se utilizează codul de abreviere cu trei litere (Tabelul 3.1), aminoacizii se separă prin cratime; dacă se utilizează codul de o literă, cratimele se omit. Când este cunoscută doar identitatea aminoacizilor fără a fi cunoscută și ordinea lor, aminoacizii se separă prin virgule. Când e cunoscută ordinea de succesiune, aminoacizii se separă prin cratime. În pentapeptida reprezentată mai jos, aminoacidul N-terminal este valina, iar histidina este aminoacidul C-terminal. Aminoacizii sunt numerotați începând cu aminoacidul N-terminal. Astfel, restul de glutamat este Glu 4, deoarece este al patrulea aminoacid de la capătul N-terminal.

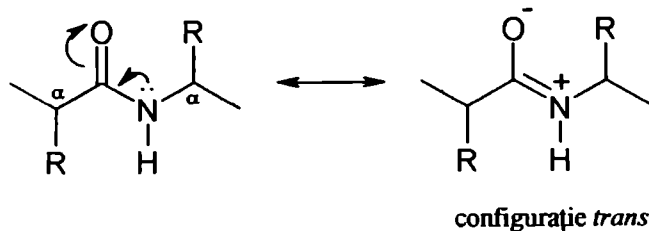
Glu, Cys, His, Val, Ala
Pentapeptida conține aminoacizii indicați,
dar ordinea lor nu este cunoscută

¹Val-²Cys-³Ala-⁴Glu-⁵His

Pentapeptida conține aminoacizii
în ordinea indicată

3.2.2. Structura legăturii peptidice

Datorită delocalizărilor electronice, legătura peptidică are aproximativ 40% caracter de legătură dublă. Atomii de carbon α din doi aminoacizi adiacenți se găsesc în poziție *trans* unul față de celălalt datorită împiedicărilor sterice care determină stabilitatea configurației *trans* în detrimentul configurației *cis*.



Din cauza caracterului parțial de dublă legătură, rotația liberă în jurul legăturii peptidice este împiedicată. Atomii de carbon și azot care aparțin legăturii peptidice, precum și ceilalți doi atomi de care aceștia sunt legați direct formează un plan rigid. Această coplanaritate locală influențează modul în care un lanț polipeptidic se poate plia, cu implicații directe asupra structurii tridimensionale a polipeptidelor și proteinelor.

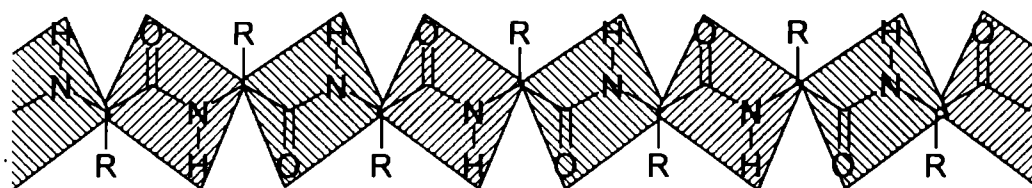
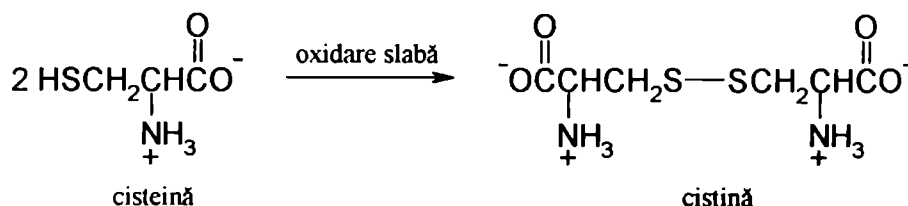
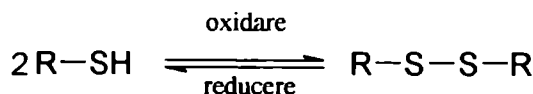


Figura 3.1. Fragment dintr-un lanț polipeptidic. Planul definit de fiecare legătură peptidică este reprezentat ca un patrulater hașurat. Grupările R legate de C- α alternează de o parte și de alta a scheletului polipeptidic

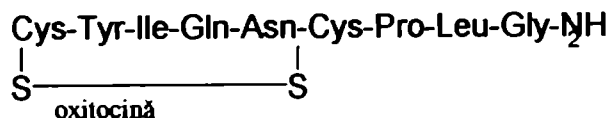
Singurul tip de legătură covalentă care mai apare în structura unei peptide în afara legăturii peptidice este legătura disulfidică. Aceasta poate lua naștere între două resturi de cisteină.



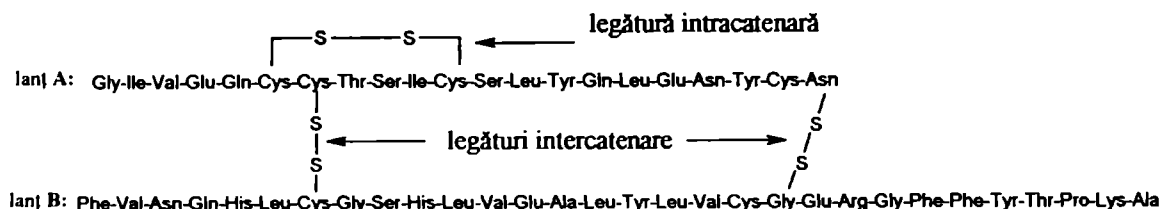
Disulfurile, R-S-S-R se formează în urma oxidării slabe a tiolilor, iar legătura disulfidică poate fi ușor redusă pentru a regenera tiolii.



Când o astfel de legătură apare între două resturi de cisteină, se poate forma o „bucă”, așa cum se formează de exemplu în hormonul hipofizar oxitocină.



Dacă resturile de cisteină se află în lanțuri diferite, legăturile disulfidice fac legătura între cele două lanțuri, ca în cazul insulinei.



Insulina este un hormon secretat de pancreas care controlează nivelul glucozei din sânge prin reglarea metabolismului glucozei. Insulina este o polipeptidă dimeră alcătuită dintr-un lanț mai scurt (lanțul A, 21 aminoacizi) și unul mai lung (lanțul B, 30 aminoacizi). În structura sa întâlnim atât **punți disulfidice intracatenare**, cât și **punți disulfidice intercatenare**.

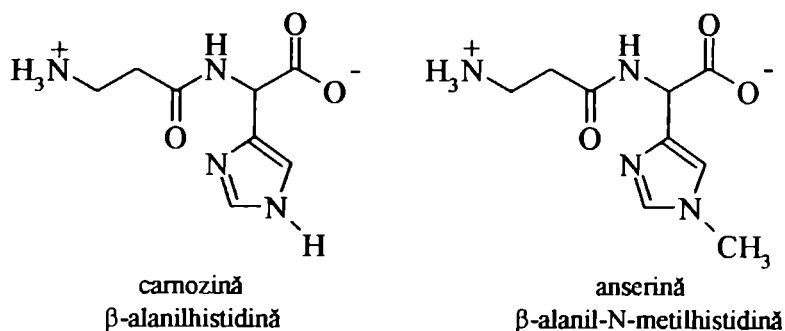
Legătura peptidică este neîncărcată electric indiferent de pH. Peptidele sunt însă încărcate electric la pH-ul fiziologic datorită grupării amino libere de la capătul N-terminal și datorită grupării carboxil libere de la capătul C-terminal, ca și datorită eventualelor resturi de aminoacid cu grupări bazice sau acide. Prin urmare, polipeptidele sunt **polielectroliți**. Ca și în cazul aminoaciziilor, pK_a -urile grupărilor ionizabile depind mult de natura mediului care le înconjoară. Peptidele sunt și ele caracterizate de pI, (pH-ul izoelectric, pH-ul la care suma sarcinilor pozitive este egală cu suma sarcinilor negative). În Tabelul 3.4 sunt prezentați parametrii câtorva peptide simple în soluție apoasă.

Tabel 3.4. Valorile pK_a pentru câteva peptide sintetice

Peptida	pK_{a1} COOH	pK_{a2} $^+NH_3$	pI
Gly-Gly	3.14	8.25	5.70
Gly-Ala	3.15	8.23	5.69
Ala-Gly	3.17	8.18	5.68
Gly-Gly-Gly	3.23	8.09	5.66
Ala-Ala-Ala-Ala	3.42	7.94	5.68

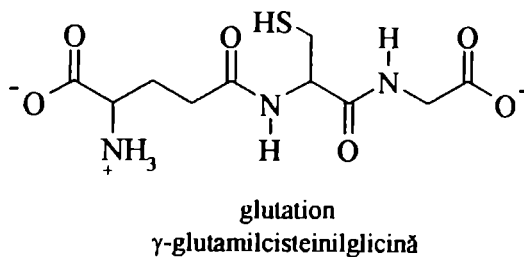
3.2.3. Oligopeptide cu rol biologic.

În organismul uman au fost identificate și caracterizate peptide care îndeplinesc importante funcții biochimice. Principalele **dipeptide** naturale sunt **carnozina** și **anserina**, cu structuri asemănătoare. Ambele dipeptide sunt considerate *atipice* nefiind constituite numai din α -aminoacizi. Ele sunt componente specifice țesutului muscular, carnozina fiind prezentă în mușchiul mamiferelor, iar anserina în mușchiul pectoral al păsărilor. Ambele iau naștere prin condensarea histidinei cu β -alanina, diferența constând în faptul că anserina conține o grupare metil în ciclul imidazolic.

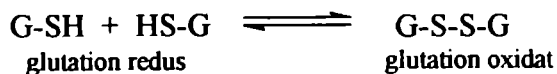


Ambele dipeptide au rolul de substanțe tampon menținând pH-ul fiziologic în timpul contracției musculare. Carnozina exercită o acțiune hipertensivă și este un stimulator al secreției glandulare. Joacă un rol activ în transportul acidului fosforic în cursul procesului de glicoliza și în formarea creatinfosfatului. Sub formă de carnozinfosfat este donor de grupări fosfat în contracția musculară.

Glutationul este o tripeptidă prezentă în toate celulele de origine vegetală și animală. Este un tripeptid atipic, format din glutamat, cisteină și glicină.



Prezența unei grupări tiolice libere, provenită de la cisteină, conferă glutatitionului proprietăți reducătoare. Hidrogenul grupării tiolice poate fi cedat unei substanțe acceptoare de hidrogen cu unirea a două molecule de glutatition, formându-se glutatition oxidat.



Funcția principală a glutathionului este de a curăța organismul de diverși agenți oxidanți toxici care apar în diferite procese biochimice redox. Agenții oxidanți sunt implicați în procesele de îmbătrânire sau de inducere a diferitelor cancere, iar glutathionul are capacitatea de a-i reduce, diminuându-le astfel potențialul toxic.

Encefalinele sunt **tetrapeptide** sintetizate de corp pentru a controla durerea. Ele au fost denumite și „analgezice naturale”. Acești compuși diminuează senzațiile de durere prin legarea de anumiți receptori cerebrali. O parte din structura lor tridimensională este probabil similară cu cea a morfinei, deoarece se leagă de aceeași receptori.

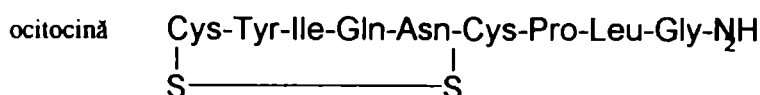
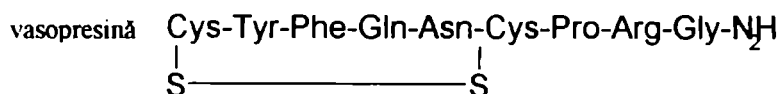


leucin-encefalină



metioninin-encefalină

Bradikinina, vasopresina și ocitocina sunt nonapeptide cu rol hormonal. Bradikinina inhibă inflamarea țesuturilor. Vasopresina controlează tensiunea arterială prin reglarea pe care o exercită asupra contracției mușchilor netezi, fiind în același timp și antidiuretic. Ocitocina provoacă contracțiile în timpul nașterii și stimulează secreția laptelui la femeile lehuze. Vasopresina și ocitocina posedă o legătură disulfurică intracatenară, iar cruparea carboxil C-terminală este preponderent sub formă amidică. În ciuda rolului fiziologic diferit, vasopresina și ocitocina diferă structural doar prin doi aminoacizi.



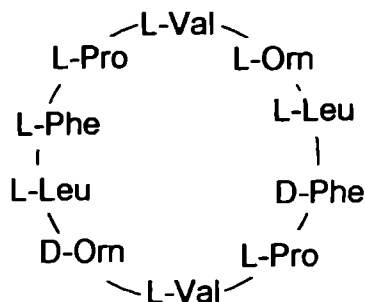
În Tabelul 3.5 sunt consemnate și alte polipeptide cu roluri biologice foarte diversă, în special hormonală.

Tabelul 3.5. Polipeptide cu activitate biologică

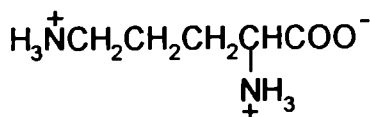
Denumire		Număr de aminoacizi	Roluri biologice
insulina		51	acțiune hipoglicemiantă
glucagonul		29	acțiune hiperglicemiantă
corticotropina		39	stimulează biosinteza hormonilor corticosteroizi
gastrina I		17	stimularea secreției gastrice
gastrina II		17	stimularea secreției gastrice
secretina		27	controlează secreția pancreasului
hormonul melanocit (α)		13	stimulează producerea de pigment în celulele melanocite ale pielii
hormonul melanocit (β)		18	stimulează producerea de pigment în celulele melanocite ale pielii

Antibioice cu structură polipeptidică. Există o serie de polipeptide naturale eliberate de microorganisme (bacterii) dintre care unele manifestă acțiune **antibiotică**, prezentând un larg interes în chimioterapia modernă. Din această categorie fac parte gramicidine, tirocidiine, bacitracine, polimixine, actinomicine, kapreomicine, walinomicine, etamicine, etc. Caracteristica esențială a acestor substanțe este prezența în lanțul peptidic al acestora, alături de aminoacizii din seria **L**, a unor aminoacizi din seria **D**, formând uneori o structură ciclică. Frecvent în structura acestora întâlnim acizii L-aspartic și L-glutamic.

Gramicidina S este un antibiotic decapeptidic cu structură ciclică. Conține aminoacizii L-ornitină (L-Orn), D-ornitină (D-Orn) și D-fenilalanină. (Ornitina este un aminoacid asemănător lizinei, cu o grupare metilen mai puțin).



gramicidină S



ornitină

3.3. Structura proteinelor

Proteinele sunt biocomponente structurale și funcționale de însemnătate primordială pentru procesul vieții și care prezintă cel mai înalt grad de complexitate, varietate și specificitate. Denumirea de **proteină** derivă de la cuvântul grecesc *proteos*, „primul”, în deplin acord cu rolul fundamental al acestor substanțe în lumea vie. Proteinele îndeplinesc funcții extrem de variate, rolurile biologice fiind diferite, în funcție de tipul proteinelor.

Din unirea unui număr mare (>50) de aminoacizi rezultă lanțurile peptidice din constituția proteinelor. Aceste lanțuri diferă unele de altele sub raportul lungimii, naturii și secvenței aminoacizilor constitutivi. De multe ori în constituția unei proteine nu intră un singur lanț polipeptidic, ci mai multe, iar acestea nu sunt desfășurate în lungime ci răsucite sau cu catena dispusă în zigzag, în mai multe planuri. Pe de altă parte, datorită diverselor grupări funcționale libere din radicalii aminoacizilor, lanțurile se pot consolida prin stabilirea unor legături intra- sau intercatenare. Ținând seama de toate acestea, se înțelege că la moleculele proteice se întâlnește o organizare specială, care constă în **patru** categorii de structuri sau niveluri de organizare: 1) **Structura primară**, determinată de succesiunea aminoacizilor în catena polipeptidică și de poziția punților disulfurice. 2) **Structura secundară** descrie fragmente cu conformație regulată din constituția lanțului proteic și cum acesta se pliază în spațiu. 3) **Structura terțiară** descrie structura tridimensională a întregii molecule proteice. 4) **Structura cuaternară** descrie modul în care lanțurile proteice individuale se aranjează în spațiu în raport cu alte proteine.

Proteinele îndeplinesc cele mai diverse funcții în organism. Există o rețea proteică intracelulară cu rol structural care asigură forma și integritatea celulară. Filamentele de actină și miozină formează aparatul contractil al mușchiului. Hemoglobina transportă oxigen, în timp ce anticorpii îndepărtează agenții străini celulei. Enzimele catalizează practic toate reacțiile din organism. Receptorii conferă celulei capacitatea de a sesiza diferite semnale hormonale sau produse de alți mesageri chimici. Un scop primordial al medicinei moleculare îl constituie identificarea acestor proteine a căror prezență, absență sau deficiență este asociată cu anumite stări fiziologice sau boli. Determinarea structurii primare a proteinelor oferă datele necesare identificării precum și informația necesară identificării și clonării genei care o codifică.

3.3.1. Purificarea proteinelor

Pentru a putea determina secvența aminoacizilor dintr-o proteină, este esențial ca aceasta să fie în prealabil izolată în stare pură. O celulă conține mii de proteine diferite, fiecare în cantități diferite. Izolarea unei anumite proteine în cantitate suficientă pentru a putea fi analizată poate presupune mai multe etape succesive de purificare. Metodele clasice se bazează pe diferențele de solubilitate a proteinelor în funcție de pH (precipitare izoelectrică), în funcție de polaritate (precipitare cu etanol sau acetonă) sau în funcție de tărie ionică (precipitare cu sulfat de amoniu). Ulterior precipitării diferențiale, proteinele se purifică prin metode cromatografice și electroforetice.

La separările cromatografice se realizează partiția moleculelor între două faze: una mobilă și cealaltă staționară. Pentru separarea moleculelor mici (aminoacizi, monozaharide) faza staționară poate fi hârtie cromatografică (cromatografie pe hârtie) sau un strat subțire de celuloză, silicagel sau oxid de aluminiu (cromatografia în strat subțire)

Cromatografia pe coloană. Cromatografia pe coloană a proteinelor utilizează ca fază staționară o coloană de particule sferice de celuloză, acrilamidă sau silicagel. De obicei, suprafața acestor sfere este „îmbrăcată” cu grupări funcționale, astfel încât să se permită interacții între faza staționară și moleculele proteice, interacții bazate pe încărcarea electrică, hidrofobicitate sau legare de ligand. Un amestec proteic se aplică pe coloană, după care faza mobilă este trecută (eluată) prin această coloană, antrenând diferit moleculele proteice. Pe măsură ce eluantul trece prin coloană, antrenează diferențial moleculele proteice.

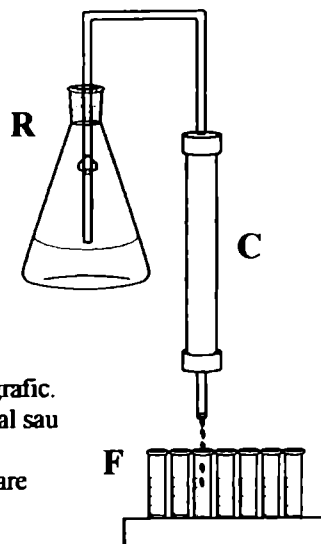


Figura 3.2. Componentele unui aparat cromatografic.
R: rezervorul fazei lichide (furnizată gravitațional sau cu ajutorul unei pompe). **C:** coloana care conține faza staționară. **F:** collectorul de fracții care culege porții de eluat în eprubete separate.

Cromatografia de partiție. Separarea prin cromatografie pe coloană depinde de afinitatea relativă a diferitelor proteine pentru o anumită fază staționară sau pentru o anumită fază mobilă. Asocierea dintre fiecare proteină și faza staționară este slabă și tranzitorie. Proteinele care interacționează mai puternic cu faza staționară sunt reținute pe coloană mai mult și sunt eluate mai târziu. Durata asocierii unei proteine cu faza staționară depinde atât de natura fazei staționare cât și de natura fazei mobile. Separarea optimă a unei proteine dintr-un amestec depinde de compoziția acestor două faze.

Cromatografia de excluziune sau gel filtrarea separă proteinele în funcție de **raza Stokes**, adică diametrul sferei pe care molecula de proteină o ocupă în soluție. Raza Stokes depinde de masa moleculară a proteinei și de forma sa (o proteină alungită ocupă un volum mai mare decât o proteină sferică cu aceeași masă). Cromatografia de excluziune folosește ca fază staționară granule poroase. Proteinele cu rază Stokes prea mare pentru a putea pătrunde prin porii granulelor (proteinele excluse) rămân în faza mobilă și sunt eluate primele, înaintea proteinelor care pot penetra prin pori (proteinele incluse). Astfel, proteinele pot fi separate în ordinea razelor lor Stokes.

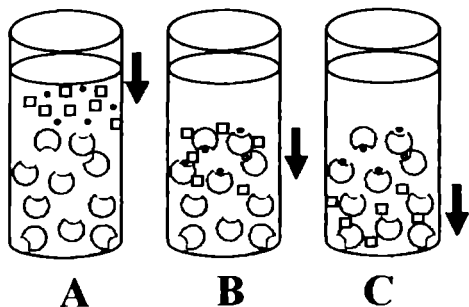


Figura 3.3. Cromatografia de excluziune. A. Un amestec de molecule mari (pătrate) și mici (cercuri) se aplică pe o coloană de gel filtrare. B. După intrarea în coloană, moleculele mici pătrund în porii fazei staționare, în timp ce moleculele mai mari sunt excluse. C. Pe măsură ce faza mobilă înaintază prin coloană moleculele mari curg împreună cu ea, în timp ce moleculele mici rămân din ce în ce mai în urmă.

Cromatografia de absorbție. În cromatografia de absorbție, amestecul proteic este aplicat pe coloană în condițiile în care proteina de interes se asociază strâns cu faza staționară. Moleculele neaderente sunt eluate primele și se aruncă, după care proteinele sunt eliberate succesiv prin ruperea legăturilor care stabilizează complexul proteină-fază staționară, de cele mai multe ori folosind un eluent cu gradient crescător de concentrații de anumite săruri. Compoziția fazei mobile este schimbată gradat astfel încât moleculele să fie eliberate în ordinea afinității lor pentru faza staționară.

Cromatografia cu schimbători de ioni. În cromatografia cu schimbători de ioni, proteinele interacționează cu faza staționară în funcție de încărcarea lor electrică. Proteinele care au o încărcătură pozitivă la un anumit pH vor adera la faza staționară încărcată negativ cu grupări funcționale de tip carboxilat sau sulfat (schimbători cationici). Invers, proteinele care au o încărcătură negativă la un anumit pH vor adera la faza staționară încărcată pozitiv cu grupări funcționale de tip amine terțiare sau cuaternare (schimbători anionici). Proteinele, care sunt poli-ioni, concurează împotriva ionilor mono- sau divalenți în legarea de suportul staționar „schimbător de ioni”. De exemplu, proteinele se leagă de DEAE (dietilaminoetil)-celuloză prin înlocuirea contraionilor (de obicei Cl^- sau AcO^-) care neutralizează amina protonată. Proteinele legate sunt apoi îndepărtate selectiv ridicând gradat concentrația de ioni din faza mobilă. Proteinele sunt eluate în ordine inversă forței de interacție cu faza staționară. Deoarece sarcina netă a unei proteine depinde de pH, eluarea secvențială a proteinelor se poate face și prin modificarea pH-ului în faza mobilă. Pentru a fi purificată, o proteină poate suferi mai multe runde de ion-cromatografie la pH-uri diferite, astfel încât proteine care de exemplu sunt co-eluate la un anumit pH, pot fi separate folosind ulterior alt pH.

Cromatografia prin interacții hidrofobe. Acest tip de cromatografie separă proteine pe baza tendinței lor de a se asocia cu o fază staționară acoperită cu grupări hidrofobe (fenil-Sepharose, octil-Sepharose). Proteinele cu fragmente hidrofobe expuse la suprafață aderă la faza staționară prin interacții hidrofobe, care sunt mărite prin folosirea unei faze mobile cu tărie ionică mare. Proteinele neaderente sunt eluate primele, după care polaritatea fazei mobile este scăzută gradat prin scăderea

concentrației ionice. Dacă interacțiile dintre proteină și faza staționară sunt prea puternice, se pot adăuga în faza mobilă etanol sau glicerol pentru a micșora polaritatea fazei mobile și slăbi interacțiile hidrofobe.

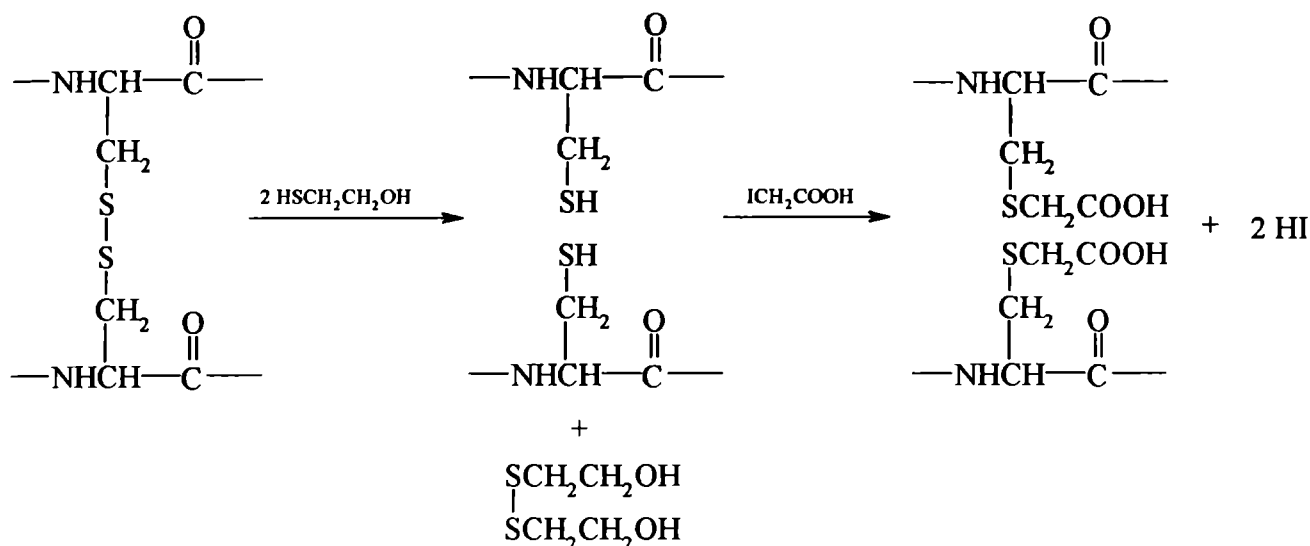
Cromatografia de afinitate. Cromatografia de afinitate se folosește de selectivitatea pe care majoritatea proteinelor o manifestă față de anumiți liganzi. De exemplu, enzimele pot fi purificate utilizând o fază staționară de care sunt legate substratele, produșii de reacție, coenzimele sau inhibitorii enzimelor respective. Teoretic, numai proteinele care interacționează cu ligandul imobilizat vor adera la faza staționară. Proteinele aderente sunt ulterior eluate fie cu o soluție de ligand sau, mai puțin selectiv, prin ruperea legăturilor proteină-ligand cu uree, clorhidrat de guanidină, soluții tampon cu pH slab acid sau soluții concentrate de ioni. Printre cele mai performante faze staționare sunt cele utilizate pentru purificarea proteinelor recombinante (modificate genetic), cum ar fi faze staționare cu ioni de Ni^{2+} ce leagă proteinele cu coadă polihistidinică, sau faze staționare cu glutation care leagă proteinele recombinante legate de un fragment de glutation-S-transferază.

Peptidele pot fi purificate prin HPLC. Fazele staționare utilizate în coloanele cromatografice clasice sunt materiale poroase a căror compresibilitate mare limitează scurgerea fazei mobile. Cromatografia în fază lichidă la presiune ridicată (High-Pressure Liquid Chromatography, HPLC) utilizează granule necompresibile de silicagel sau alumină ca fază staționară și presiune de până la câteva mii de psi. Umplutura necompresibilă a coloanei permite atât viteze mari de eluție cât și rezoluție crescută. HPLC poate separa amestecuri complexe de lipide și peptide a căror proprietăți diferă doar puțin. Pentru separarea peptidelor, se utilizează HPLC cu fază inversată (reversed-phase HPLC) în care faza staționară este hidrofobă (oligomeri alifatici cu 3-18 atomi de carbon). Amestecul peptidic este eluat cu un gradient apos al unui solvent organic miscibil cu apa (acetonitril, metanol).

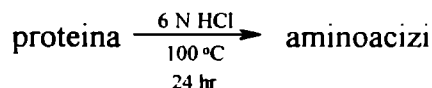
Puritatea unei proteine se determină prin electroforeză. Electroforeza separă molecule încărcate electric în funcție de viteza cu care acestea migrează într-un câmp electric aplicat. Cea mai utilizată metodă pentru determinarea purității unei proteine este SDS-PAGE, sau cromatografia în gel de poliacril amidă în prezența dodecilsulfatului de sodiu (SDS). (PAGE = PolyAcrylamide Gel Electrophoresis). Pentru SDS-PAGE, acrilamida este întâi co-polimerizată cu o cantitate mică de N,N'-metilen bis-acrilamidă, formând o rețea poroasă prin care vor migra moleculele supuse electroforezi. SDS denaturează proteina și se leagă de ea într-un raport de o moleculă SDS la două legături peptidice. Numărul mare de molecule SDS atașate face ca molecula proteică să capete o încărcătură negativă, astfel încât proteinele vor migra prin gelul electroforetic în funcție numai de masa lor moleculară. Proteinele individuale migrate în gel pot fi vizualizate cu anumiți coloranți, cum ar fi Coomassie blue.

3.4.2. Determinarea structurii primare a proteinelor

După purificarea unei proteine, următorul pas este reducerea legăturilor disulfidice eventual prezente, de obicei cu 2-mercaptoetanol, urmată de o reacție cu acid iodacetic, care împiedică reformarea punților disulfidice.



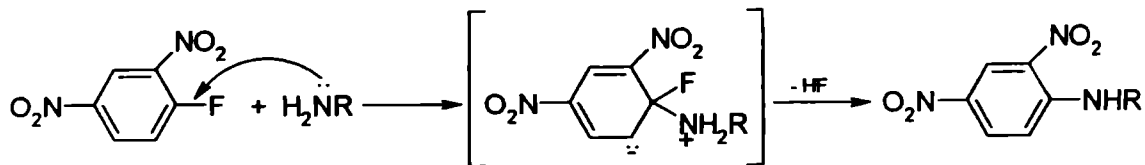
Următorul pas constă în determinarea felului și numărului de aminoacizi componenți. Pentru aceasta, o probă de proteină se hidrolizează:



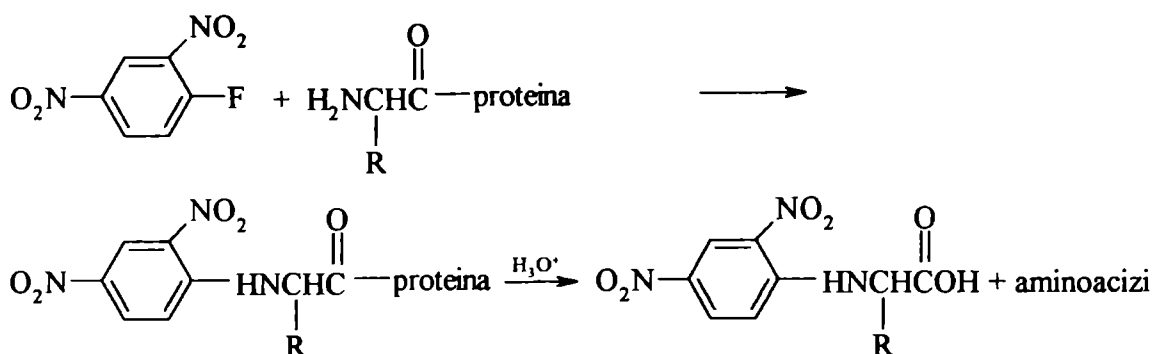
Acest tratament distruge toate legăturile amidice, inclusiv cele din Asn și Gln. Numărul de Asn și Gln se determină prin alte metode. Hidroliza acidă distruge nucleul indolil din Trp, așa că pentru determinarea Trp se folosește separat hidroliza în mediu bazic. Amestecul de aminoacizi obținut prin hidroliză este trecut printr-un **analizor de aminoacizi** care determină numărul și tipul de aminoacizi.

Identificarea aminoacidului N-terminal

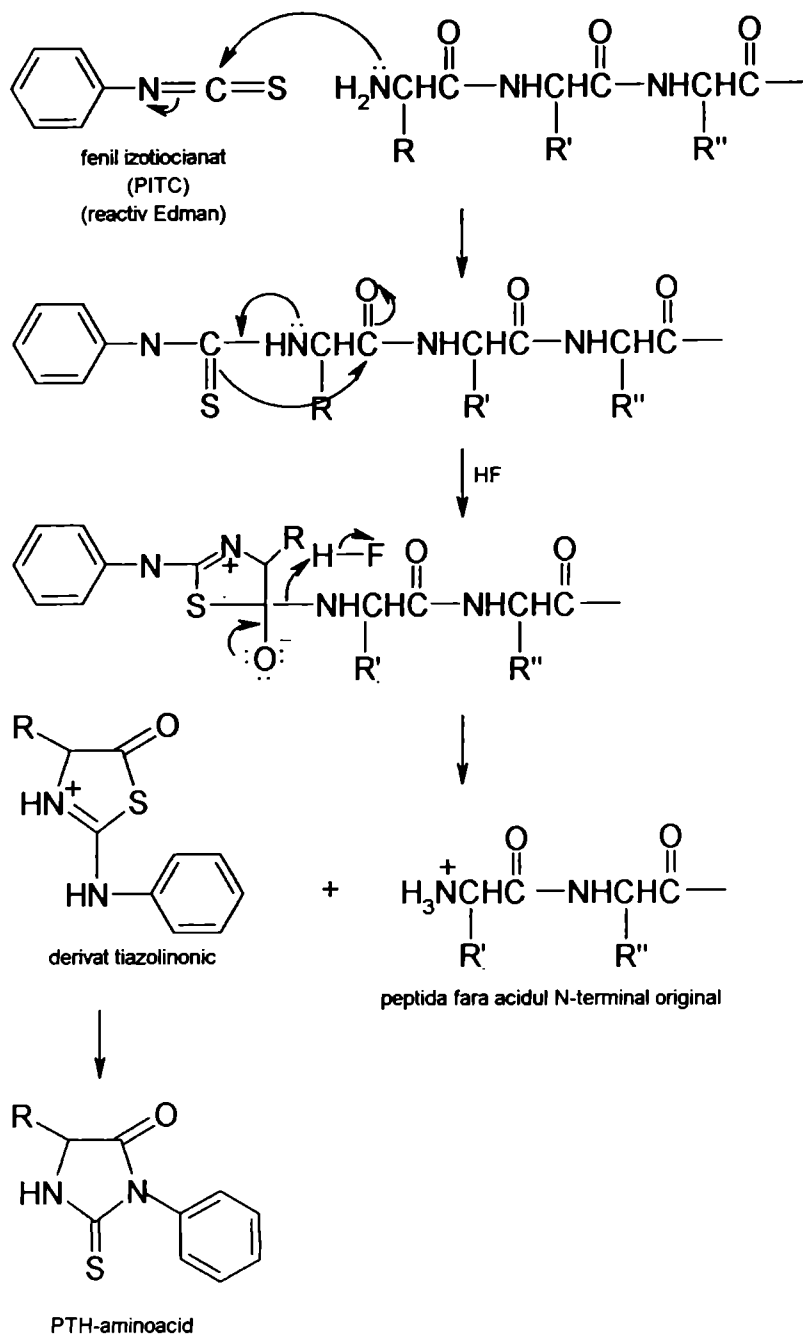
Există câteva metode de determinare a aminoacidului N-terminal. **Metoda Sanger** utilizează proprietatea grupării ---NH_2 de a reacționa cu 2,4-dinitrofluorbenzen dând derivați 2,4-dinitrofenil galbeni.



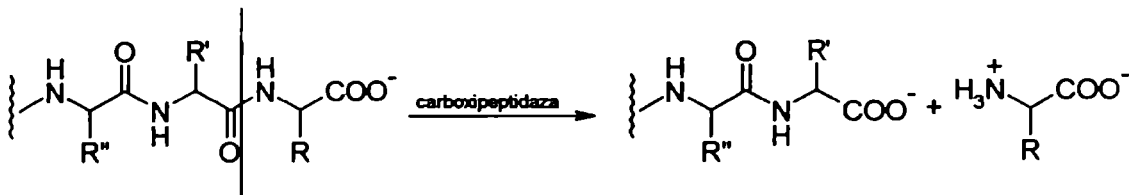
Reactantul Sanger reacționează ușor cu aminoacidul N-terminal al unei proteine, transformând gruparea amino în grupare arilamino. După hidroliză, aminoacidul N-terminal rămâne legat de gruparea 2,4-dinitrofenil putând fi ușor separat de ceilalți aminoacizi și identificat. Principalul dezavantaj al acestei metode este ca nu poate fi aplicată secvențial ca metoda Edman.



Metoda Edman. Fenilizotiocianatul (PITC) sau reactivul Edman reacționează selectiv cu aminoacidul N-terminal, iar derivatul tiazolinonic rezultat poate fi clivat în condiții acide blânde. Derivatul tiazolinonic este extras cu un solvent organic și în prezența acidului trece într-un derivat de feniltiohidantoină (PTH) mai stabil, generând un nou capăt N-terminal. Se pot face astfel mai multe serii succesive de degradări Edman pe aceeași probă de proteină. Din păcate nu se poate realiza secvențializarea completă a unei proteine, deoarece se acumulează produși secundari care denaturează rezultatele. Secvențializarea Edman a fost automatizată, utilizându-se o matrice solidă pentru imobilizarea peptidei și HPLC pentru a identifica derivații PTH. Secvențiatoarele moderne pot efectua până la 50 degradări succesive, pe o probă de câțiva picomoli.



Determinarea aminoacidului C-terminal. Aminoacidul C-terminal se identifică prin hidroliza cu o enzimă numită **carboxipeptidază**, care catalizează specific hidroliza aminoacidului C-terminal. Carboxipeptidazele sunt **exopeptidaze** (enzime care catalizează hidroliza unei legături peptidice aflate la marginea lanțului peptidic).



Pe măsură ce primul aminoacid este îndepărtat, enzima atacă următorul aminoacid, până când întreaga proteină este hidrolizată. Prin determinarea vitezei de apariție a diferiților aminoacizi în hidrolizat se pot identifica astfel primii 3-4 aminoacizi de la capătul C-terminal.

Fragmentarea lanțurilor proteice. Metoda Edman poate fi utilizată fără probleme pentru secvențializarea primelor 20-30 resturi de aminoacizi, numai că moleculele proteice au minim 50 aminoacizi (foarte multe de ordinul sutelor). În consecință, majoritatea proteinelor necesită clivare înainte de a putea fi secvențializate. Acest lucru se face prin **hidroliză parțială** în mediu slab acid, când numai anumite legături peptidice sunt atacate. Fragmentele rezultate se separă, se purifică (prin reversed-phase HPLC) și se secvențializează. Secvența proteinei originale se poate deduce aliniind secvențele fragmentelor și cautând porțiunile care coincid.

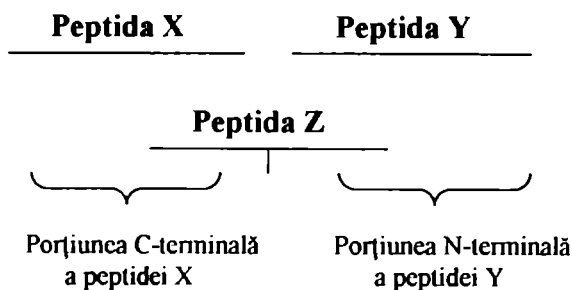
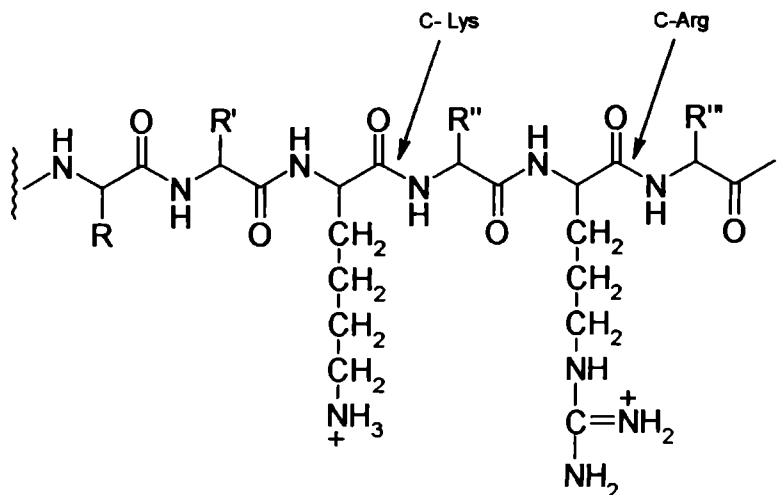


Figura 3.4. Secvența de aminoacizi a peptidei Z, care coincide parțial cu cea a peptidelor X și Y, demonstrează că peptidele X și Y se regăsesc în proteina originală în ordinea X→Y și nu Y←X.

Proteinele pot fi fragmentate și cu **endopeptidaze** (enzime care catalizează hidroliza unei legături peptidice aflate în interiorul lanțului peptidic). Tripsina, chimotripsina, elastaza sunt endopeptidaze care hidrolizează specific anumite legături peptidice. De exemplu, tripsina catalizează scindarea legăturilor peptidice în care sunt implicate lizina sau arginina.



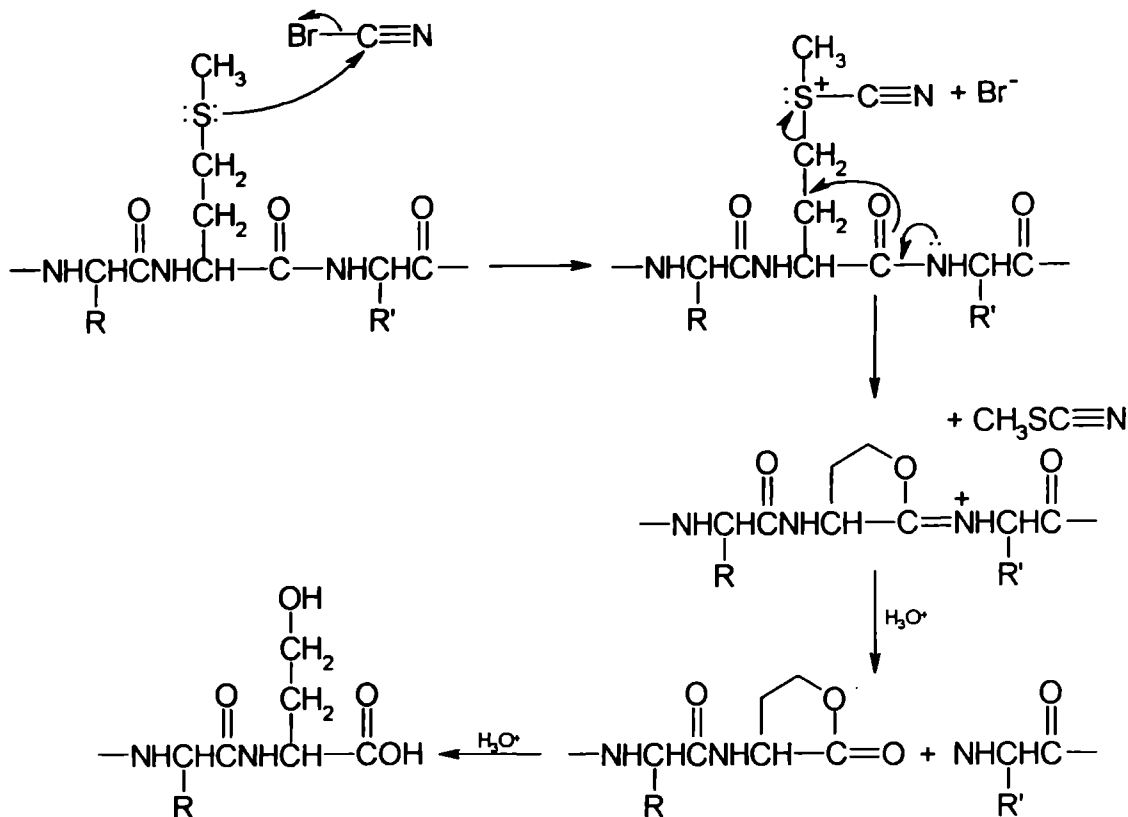
Principalii agenți de clivare specifică a proteinelor sunt prezentați în Tabelul 3.4.

Tabelul 3.4. Specificitatea agenților de clivare a proteinelor

Reactiv	Specificitate
Reactivi chimici Reactiv Sanger Reactiv Edman CNBr (bromcian) Hidroxilamină Acid slab	înlătură aminoacidul N-terminal înlătură aminoacidul N-terminal Met-X Asn-Glx Asp-Pro
Exopeptidaze* Carboxipeptidaza A Carboxipeptidaza B	înlătură aminoacidul C-terminal (nu și Arg sau Lys) înlătură aminoacidul C-terminal (doar Arg și Lys)
Endopeptidaze Tripsină* Chimotripsină* Elastasă* Endopeptidază Lys-C Endopeptidază Arg-C Endopeptidază Asn-N	Arg-X, Lys-X aminoacid hidrofob (Phe, Tyr, Trp)-X Gly-X, Ala-X Lys-X Arg-X X-Asn Glu-X, mai ales când X este hidrofob

*Clivarea nu are loc când prolina e implicată în legătură.

Mecanismul clivării cu bromcian (BrCN) este prezentat mai jos:



Detectarea modificărilor covalente prin spectrometria de masă. Spectrometria de masă, care face distincție între specii moleculare exclusiv pe baza masei lor, poate fi utilizată pentru a depista modificările posttranslaționale (care survin după ce proteina a fost biosintetizată la nivel ribozomal) ale aminoacizilor dintr-o proteină. Astfel, pot fi detectate grupări hidroxi, fosfat, etc. fiecare grupare contribuind cu un increment specific la masa aminoacidului modificat (Tabelul 3.5).

Tabelul 3.5. Creșterea de masă produsă de modificările posttranslaționale

Modificare	Creșterea de masă (Da)
Fosforilare	80
Hidroxilare	16
Metilare	14
Acetilare	42
Miristilare	210
Palmitilare	238
Glicozilare	162

Spectrometrele de masă convenționale sunt utilizate pentru determinarea moleculelor cu masă moleculară până la 1000 Da, dar există și spectrometre speciale pentru analiza compușilor cu mase

moleculare mari. Inițial, analizarea polipeptidelor și proteinelor prin spectrometrie de masă a fost mult îngreunată de dificultatea cu care acești compuși pot fi volatilizați. Între timp, tehnici de felul MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption) și dispersie prin electropulverizare (electrospray dispersion) permit ca pâna și polipeptide mari ($> 100\,000$ Da) să fie detectate cu o acuratețe extraordinară (± 1 Da). Utilizând dispersia prin electropulverizare, peptidele scoase dintr-un cromatograf HPLC sunt imediat introduse în spectrometrul de masă pentru analiză. Aici, peptidele sunt fragmentate prin bombardare cu atomi de heliu, iar masele diverselor fragmente sunt înregistrate. Deoarece legătura peptidică este mult mai labilă decât legăturile C-C, cele mai abundente fragmente vor diferi între ele cu unități echivalente de 1-2 aminoacizi. Deoarece – cu excepția leucinei și izoleucinei – masele individuale ale aminoacizilor sunt unice, secvența unei polipeptide poate fi dedusă din masele fragmentelor componente.

Amestecurile complexe de peptide pot fi acum analizate fără o purificare anterioară utilizând echivalentul a două spectrometre de masă legate în serie (spectrometria de masă în tandem).

Biologia moleculară a revoluționat metodele de determinare a structurii primare a proteinelor. Cunoașterea secvenței de ADN care codifică o proteină permite deducerea structurii primare a proteinei respective. Până în prezent, genomurile multor specii, inclusiv genomul uman, au fost secvențializate complet, bazele de date fiind accesibile liber pe Internet. Algoritmi computerizate de căutare permit identificarea fragmentelor de ADN (ORF, open reading frame) care codifică proteine prezumtive. Invers, secvențe scurte de aminoacizi pot fi utilizate pentru a identifica secvența de ADN codificator.

În timp ce genomul uman a fost complet descifrat, **proteomul** (totalitatea seturilor de proteine caracteristice unei specii, sintetizate de celule în diferite condiții) este departe de a fi înțeles, iar bioinformatica este metoda care va avea un rol de bază în descifrarea sa.

4. Nivele Superioare de Organizare a Structurii Proteinelor

Proteinele catalizează reacțiile metabolice, induc mobilitatea celulară, alcătuiesc „frânghiile” și „cablurile” ce conferă integritate structurală părului, oaselor, tendoanelor, dinților. În natură, forma urmează funcției. Varietatea structurală a proteinelor umane reflectă deci diversitatea și sofisticarea funcțiilor lor biologice. Maturarea unei polipeptide nou-sintetizate într-o proteină funcțională presupune plierea lanțului polipeptidic într-un aranjament spațial specific numit **conformație**. În timpul maturării, **modificări postranlaționale** pot avea loc cu adăugarea unor grupări chimice noi sau cu îndepărtarea unui fragment peptidic cu rol tranzitoriu. Deficiențele genetice sau nutriționale care afectează maturarea proteinelor pot avea efecte majore asupra stării de sănătate. Exemple din prima categorie includ **maladia Creutzfeldt-Jakob**, **maladia Alzheimer** și **encefalopatia spongiformă bovină** (boala vacii nebune). **Scorbutul** este o deficiență nutrițională provocată de lipsa vitaminei C, care perturbă maturarea proteinelor.

4.1. Clasificarea proteinelor. Oamenii de știință au clasificat inițial proteinele pe baza unor proprietăți cum ar fi solubilitatea, forma sau prezența în structura lor a unor componente neproteice. De exemplu, proteinele care pot fi extrase din celule utilizând soluții cu pH-uri și tării ionice fiziologice sunt **proteine solubile**, celelalte fiind considerate **proteine insolubile**.

În funcție de forma lor, pot fi **proteine globulare** și **proteine fibrilare**. Proteinele globulare au o formă aproximativ sferică sau ovoidală având **raportul axial** (raportul dintre cea mai mare dimensiune și cea mai mică dimensiune) mai mic decât 3. Majoritatea enzimelor sunt globulare, cu un volum intern mare care furnizează un spațiu amplu pentru a se putea forma cavități cu geometrii, încărcări electrice, hidrofilicitate sau hidrofobicitate specifice, necesare pentru a lega substratele enzimatice și pentru a promova cataliza. Prin contrast, majoritatea proteinelor structurale adoptă conformații alungite. Acestea sunt proteine fibrilare și au raportul axial 10 sau mai mare.

În funcție de produșii rezultați la hidroliză, proteinele pot fi **holoproteine** sau **heteroproteine**. La hidroliză acidă, bazică sau enzimatică holoproteinele pun în libertate numai α -aminoacizi. Heteroproteinele au o compoziție complexă fiind formate dintr-o parte proteică (**apoproteina**) și o parte neproteică (**componenta prostetică**). Componenta prostetică poate fi de natură chimică diferită (glucide, lipide, acizi nucleici, porfirine, metale). În cazul heteroproteinelor, legarea grupării prostetice de apoproteină se face prin legături chimice covalente și necovalente care le conferă un caracter de stabilitate.

Lipoproteinele și **glicoproteinele** conțin lipide și respectiv carbohidrați legați covalent. Mioglobina, hemoglobina, citocromii conțin ioni metalici strâns asociați, fiind denumite **metaloproteine**, etc. Odată cu dezvoltarea și aplicarea tehnicilor de determinare a structurii primare a proteinelor au apărut scheme de clasificare mai precise, bazate pe similarități sau pe gradul de

omologie privind secvența sau structura. Cu toate acestea însă, mulți termeni din vechea clasificare rămân în continuare în uz.

Natura modulară a sintezei și organizării spațiale a proteinelor este materializată în conceptul de nivele de structură, care sunt: **structura primară**, care este determinată de succesiunea aminoacizilor în lanțul polipeptidic; **structura secundară**, care este dată de plierea unor fragmente polipeptidice scurte (3-30 resturi de aminoacizi) în unități ordonate geometric; **structura terțiară**, sau asamblarea tridimensională a unităților structurale secundare pentru a forma unități funcționale mai mari cum ar fi polipeptida matură și domeniile sale; **structura cuaternară**, dată de numărul și tipul de lanțuri proteice și aranjamentul lor spațial.

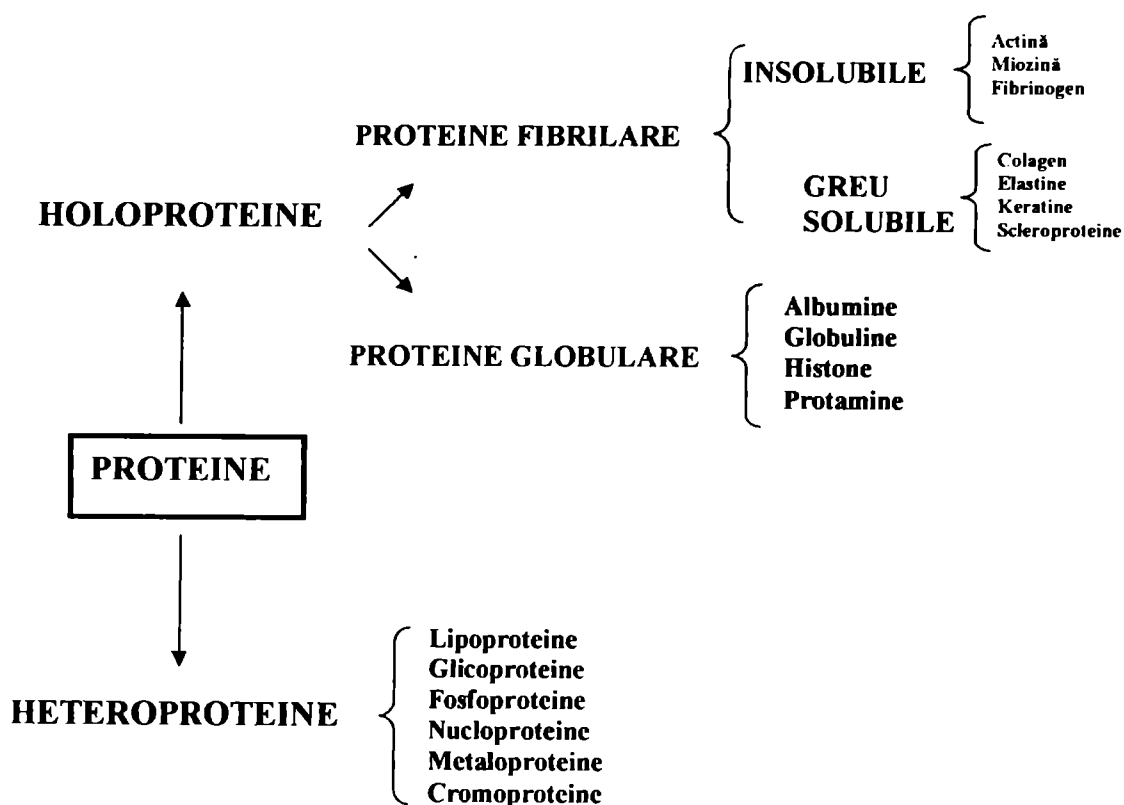
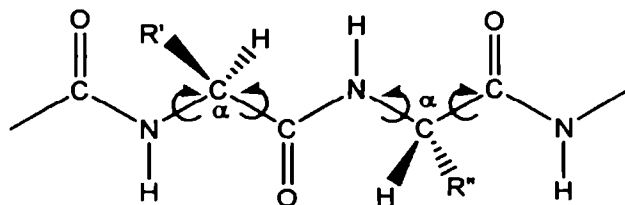


Figura 4.1. Clasificarea proteinelor

4.2. Structura secundară a proteinelor

Datorită rigidității legăturii peptidice (Secțiunea 3.2.2.) rotația liberă este permisă numai în jurul a două din cele trei tipuri de legături din scheletul polipeptidic: C_{α} - C_{carbonil} și C_{α} -N.



Unghiul de rotație în jurul legăturii C_{α} -N este denumit phi (Φ), iar unghiul de rotație în jurul legăturii C_{α} - C_{carbonil} este denumit psi (Ψ). Pentru orice aminoacid diferit de glicină, majoritatea combinațiilor Φ - Ψ sunt interzise din cauza împiedicărilor sterice. Conformațiile care implică prolina sunt chiar mai restricționate, din cauza absenței rotației libere în jurul legăturii C_{α} -N.

Regiuni cu structură secundară ordonată apar atunci când o serie succesivă de aminoacizi adoptă unghiuri Φ și Ψ similare. Există două categorii de structuri secundare, α -helix și β -pleated sheet (planuri pliate). Segmente extinse de aminoacizi (de exemplu buclele) posedă o gamă variată din aceste unghiuri.

4.2.1. Structura α -helix

Scheletul polipeptidic dintr-un α -helix este răsucit în mod egal în jurul fiecărui C_{α} cu un unghi Φ de aproximativ -57° și un unghi Ψ de aproximativ -47° . O spiră completă a helixului conține în medie 3,6 resturi de aminoacizi, iar înălțimea spirei este de 0,54 nm.

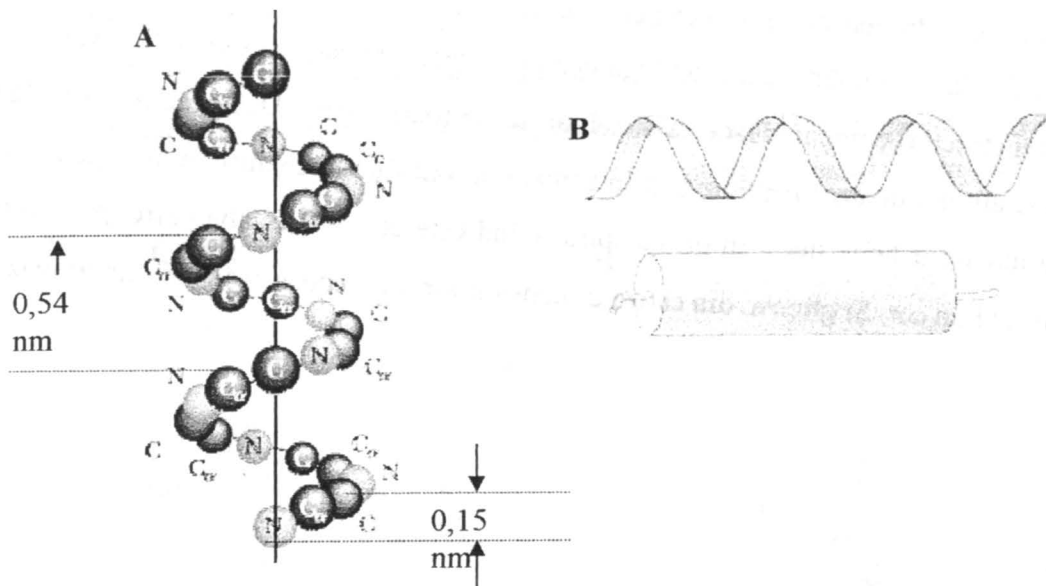


Figura 4.2. Structura α -helix. **A.** Aranjarea catenei polipeptidice în jurul axei unui α -helix. **B.** Reprezentarea convențională a unui α -helix

Grupările R din fiecare rest de aminoacid inclus într-un α -helix sunt îndreptate spre exterior.

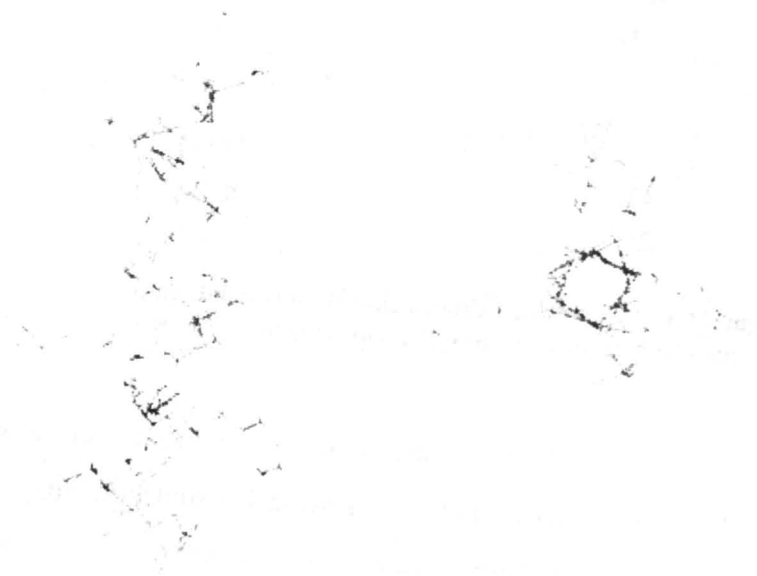


Figura 4.3. Vedere de sus și de-a lungul axei unui α -helix. Grupările R sunt orientate în afara helixului.

Proteinele naturale conțin numai α -aminoacizi, motiv pentru care α -helixul spre dreapta este mai stabil decât cel spre stânga, și numai α -helixuri orientate spre dreapta există în natură. Diagramele schematice ale proteinelor reprezintă α -helixurile prin cilindri sau panglici spiralate. Stabilitatea α -helixurilor derivă din legăturile de hidrogen care se formează între atomii de oxigen din carbonilul

peptidic și atomul de hidrogen de la azotul peptidic care aparține aminoacidului din poziția a patra. Capacitatea de a forma un număr maxim de legături de hidrogen precum și interacțiile van der Waals din miezul acestei structuri compacte face ca α -helixul să fie foarte stabil. Deoarece resturile de prolină nu au hidrogen la atomul de azot peptidic și prin urmare nu pot forma legături de hidrogen, prolina nu poate fi inclusă într-un α -helix decât în prima spiră. Când este prezentă în altă parte, prolina perturbă α -helixul, producând un cot. Și glicina, din cauza dimensiunilor sale reduse produce rupturi în α -helix.

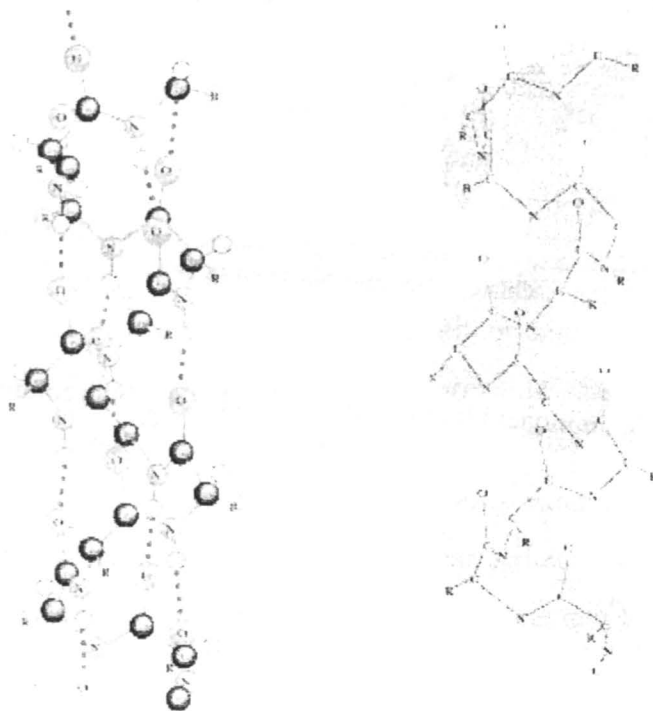


Figura 4.4. Legăturile de hidrogen dintre O și H stabilizează structura polipeptidică într-o conformație α -helix.

Multe α -helixuri au grupări R predominant hidrofobe pe o parte a axei helixului și grupări R predominant hidrofile pe cealaltă parte. Aceste **helixuri amfipatice** sunt bine adaptate pentru a forma interfețe între regiuni polare și regiuni nepolare, cum ar fi miezul intern al proteinei și învelișul său apos. Grupuri de helixuri amfipatice pot forma canale cu pori care permit anumitor molecule polare să treacă prin interiorul hidrofob al membranelor celulare.

4.2.2. Structura β -pleated sheet (planuri pliate). Al doilea tip de structură secundară regulată întâlnit în structura proteinelor este structura β -sheet. Resturile aminoacil dintr-o structură β -sheet sunt dispuse în zigzag formând un aranjament de tip „foaie pliată”, în care grupările R ale aminoacizilor adiacenți sunt orientate în direcții opuse. În contrast cu aranjamentul compact din α -helix, scheletul

peptidic din β -sheet este foarte extins. Ca și în cazul α -helixului, structura β -sheet își datorează marea stabilitate legăturilor de hidrogen care se formează între oxigenii carbonilici și hidrogenii din legăturile peptidice, doar că aceste legături se formează între atomi aparținând la două catene diferite.

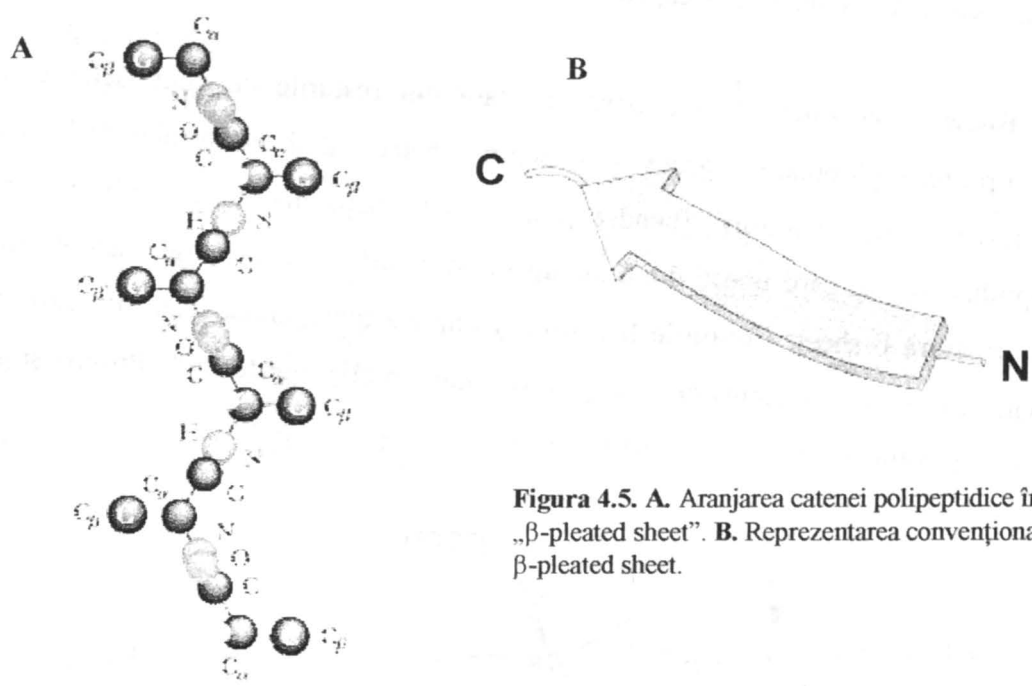


Figura 4.5. A. Aranjarea catenei polipeptidice într-o structură de tip „ β -pleated sheet”. B. Reprezentarea convențională a unei structuri β -pleated sheet.

Structurile β -sheet care se află în interacție pot fi aranjate **paralel** (segmentele polipeptidice adiacente merg în aceeași direcție $N \rightarrow C$) sau **antiparalel** (segmentele polipeptidice adiacente merg în direcții opuse, una $N \rightarrow C$, cealaltă $N \rightarrow C$).

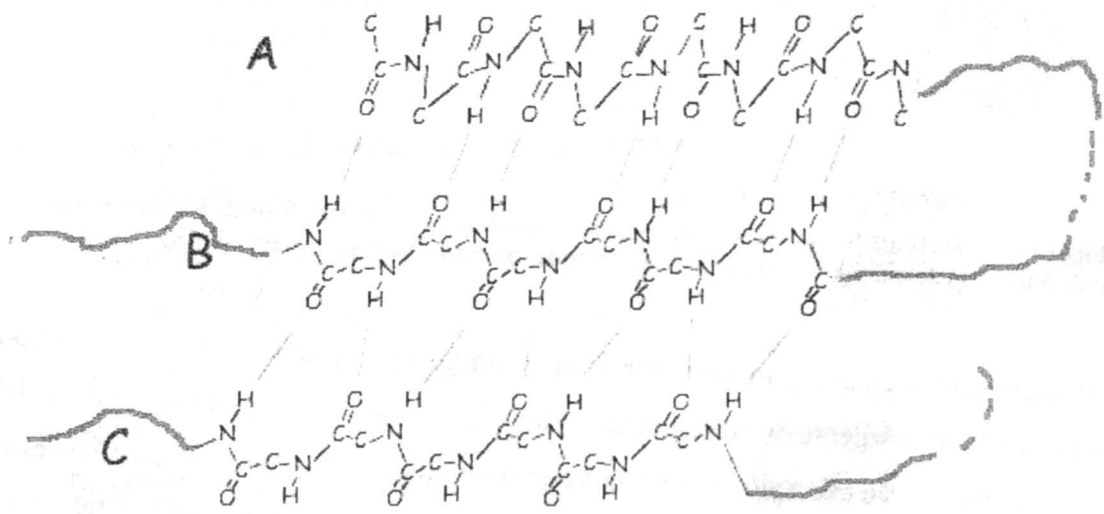


Figura 4.6. Reprezentarea unei catene polipeptidice cu structuri β -sheet în orientarea antiparalelă (A și B) și paralelă (B și C). Grupările R sunt omise pentru claritate.

Ambele structuri permit un număr maxim de legături de hidrogen între fragmentele catenare. Structura β -sheet nu este perfect plană, ci are o ușoară răsucire spre dreapta. Mănunchiuri de segmente cu structuri β -sheet formează miezul multor proteine globulare. Schematic, structura β -sheet este reprezentată ca o săgeată orientată de la capătul N-terminal spre capătul C-terminal.

4.2.3. Bucle și cotituri. Aproximativ jumătate din resturile de aminoacizi care intră în constituția unei proteine globulare se găsesc în structuri α -helix și β -sheet, restul aflându-se în „bucle” (loops), „cotituri” (turns), „îndoituri” (bends) și alte conformații mai laxe. Cotiturile se referă la segmente peptidice scurte care unesc două unități de structură secundară, de exemplu două catene adiacente cu structură β -sheet. Cotiturile β (β -turns) implică patru aminoacizi, din care primul este legat de al patrulea rest prin legături de hidrogen, rezultând o cotitură de 180° . Prolina și glicina sunt deseori prezente în cotiturile β .

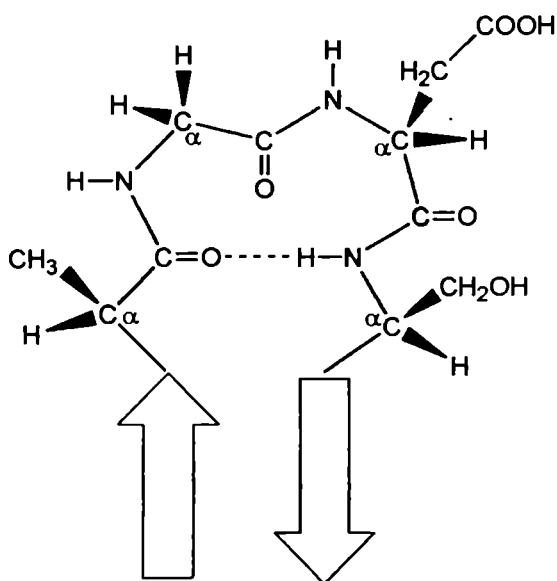


Figura 4.7. O cotitură β care leagă două segmente antiparalele cu structură β -sheet. Linia punctată indică legătura de hidrogen dintre primul și al patrulea aminoacid din segmentul Ala-Gly-Asp-Ser.

Buclele sunt segmente care conțin mai mulți aminoacizi decât numărul minim necesar pentru a conecta două unități adiacente de structură secundară. Deși au conformații neregulate, buclele au roluri biologice importante. De exemplu, pentru multe enzime, buclele care unesc domeniile responsabile de legarea substraturilor și a produșilor de reacție conțin aminoacizi care participă la cataliză. Laitmotivele **helix-bucă-helix (helix-loop-helix)** reprezintă locul de legare de ADN a unor proteine (factori care activează sau inhibă transcripția ADN în ARN). Motivele structurale de tipul helix-bucă-helix sunt

intermediare între structura secundară și cea terțiară, fiind uneori denumite **structuri supersecundare**. Deoarece multe din bucle sunt orientate spre exteriorul moleculei proteice, ele alcătuiesc situsuri ușor accesibile (**epitopi**) pentru a fi recunoscute și legate de către anticorpi.

Buclele nu au regularitate structurală; ele totuși există preponderent în anumite conformații stabilizate prin legături de hidrogen, punți electrostatice sau interacții hidrofobe cu alte regiuni ale proteinei. Nu toate regiunile unei proteine sunt însă organizate în structuri ordonate.

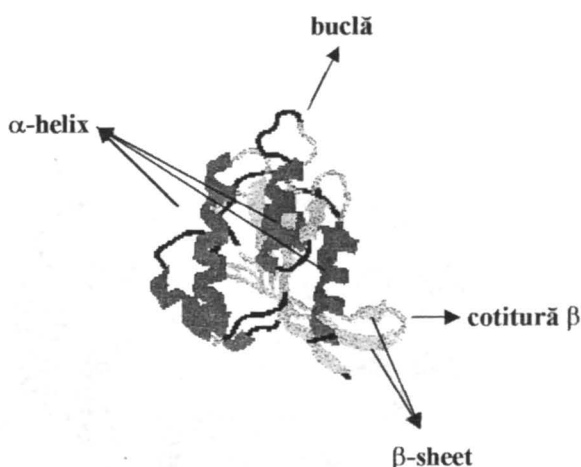


Figura 4.8. În catena unei proteine putem întâlni fragmente cu structuri secundare diferite.

Proteinele conțin și zone „dezorganizate”, de cele mai multe ori aflate spre capătul C-terminal, caracterizat printr-o flexibilitate conformațională mare. De multe ori, aceste regiuni dezorganizate pot adopta o conformație organizată atunci când se leagă de exemplu de un ligand. Această flexibilitate conformațională conferă acestor regiuni capacitatea de a acționa ca regiune reglatoare, care atunci când leagă un ligand duce la modificarea structurii și funcției proteinei.

4.3. Structura terțiară și cuaternară a proteinelor

Structura primară și secundară nu pot explica proprietățile fizico-chimice și biologice ale unei proteine. Termenul de „structură terțiară” se referă la întreaga conformație tridimensională a unei proteine. Ea indică în spațiul tridimensional modul în care fragmentele cu structură secundară - α-helixurile, β-sheet, cotiturile, îndoiturile și buclele - se assemblează pentru a forma **regiuni distincte**, și cum aceste regiuni se raportează spațial una la alta. O regiune distinctă este un fragment din structura proteinei suficient pentru a executa o anumită funcție fizică sau chimică, cum ar fi legarea unui substrat ori a unui ligand. Alte regiuni pot avea rolul de a lega o proteină de o membrană sau de a interacționa cu o moleculă care îi modulează funcția. Unele proteine (triozofosfat izomeraza sau mioglobina) au o

singură regiune funcțională. Altele, cum ar fi protein kinazele au două regiuni distincte. Protein kinazele catalizează transferul unei grupări fosfat de pe molecula de ATP la gruparea OH a unui rest de aminoacid hidroxilat dintr-o proteină sau peptidă. Fragmentul N-terminal, care este bogat în structuri β -sheet leagă ATP-ul, în timp ce regiunea C-terminală care este bogată în zone de α -helix, se leagă de substratul proteic. Grupările care catalizează transferul grupării fosfat se află localizate în bucla care face legătura dintre cele două regiuni.

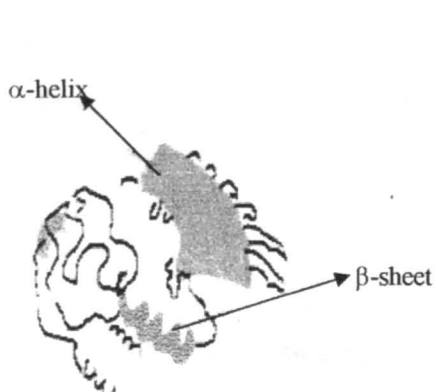


Figura 4.9. Structura terțiară este modul în care structurile secundare se organizează pentru a forma o proteină sau un protomer al unei proteine complexe

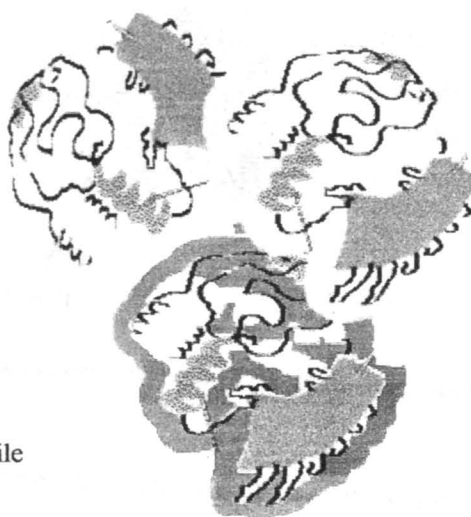


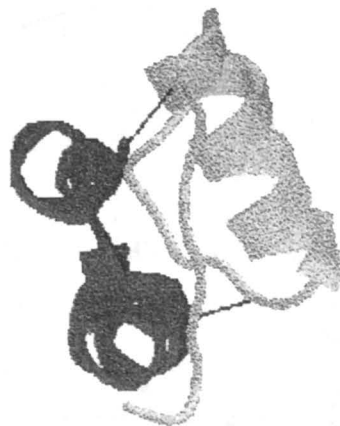
Figura 4.10. Numai proteinele cu două sau mai multe lanțuri polipeptidice au structură cuaternară

În unele cazuri, proteinele sunt ansambluri de mai multe lanțuri polipeptidice, numite **protomeri**. Structura cuaternară definește numărul și felul protomerilor și relația spațială dintre ei. Interacțiunile prin care se realizează agregatul molecular și care stabilizează structura cuaternară se realizează prin forțe necovalente: legături electrostatice, de hidrogen și van der Waals.

Proteinele **monomere** sunt alcătuite dintr-un singur lanț polipeptidic și nu au structură cuaternară. Proteinele **dimere** sunt alcătuite din două lanțuri polipeptidice.



HIV-protează



insulină

Figura 4.11. Reprezentarea structurii cuaternare a unui homodimer (HIV-protează) și a unui heterodimer (insulină).

Homodimerii conțin două copii ale aceluiași lanț polipeptidic, în timp ce heterodimerii conțin două lanțuri polipeptidice diferite. Literele grecești α , β , γ sunt folosite pentru a face distincție între protomeri, iar indicii arată numărul din fiecare. De exemplu α_4 desemnează o proteină homotetramerică, iar $\alpha_2\beta_2\gamma$ o proteină pentamerică cu trei tipuri de protomeri, doi α , doi β și unul γ .

Datorită faptului că proteinele, chiar cele mici, conțin mii de atomi, reprezentarea unei proteine cu indicarea fiecărui atom este deosebit de dificilă. De regulă se utilizează diagrame simplificate care să prezinte caracteristicile principale ale proteinei.

4.3.1. Factorii care stabilizează structura terțiară și cuaternară

Structura terțiară și cuaternară a proteinelor este stabilizată prin interacții necovalente. Dintre acestea, interacțiile hidrofobe orientează majoritatea catenelor laterale ale aminoacizilor nepolari spre interiorul moleculei de proteină, punându-i la adăpost de contactul cu apa. Alte interacții importante sunt legăturile de hidrogen sau punțile electrostatice dintre ionii carboxilat ai resturilor glutamil și aspartil și grupările încărcate pozitiv ale resturilor lizil, arginil și histidil. Deși mai slabe decât legăturile covalente, numărul mare al acestor interacții conferă un grad mare de stabilitate conformațiilor funcționale ale proteinelor.

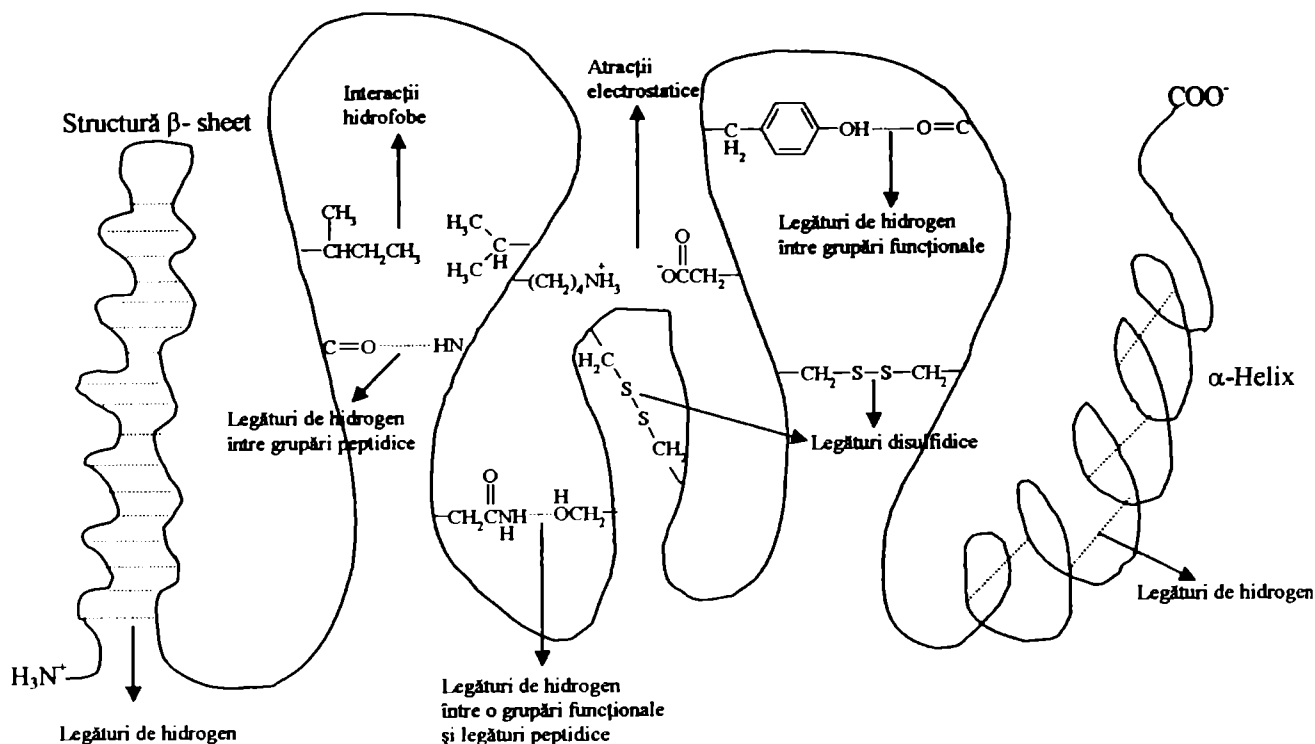


Figura 4.12. Tipuri de interacții care stabilizează structura terțiară a proteinelor

Unele proteine conțin legături disulfurice (-S-S-) care leagă grupările tio- a două resturi cisteinil. Formarea legăturilor disulfurice presupune oxidarea grupărilor tiolice și necesită oxigen. Legăturile disulfurice intracatenare conferă un plus de stabilitate conformației proteinei, pe când legăturile disulfurice intercatenare stabilizează structura cuaternară a anumitor proteine oligomere.

4.3.2. Denaturarea proteinelor

Denaturarea reprezintă distrugerea organizării structurii terțiare și cuaternare a unei proteine. Acest lucru poate fi realizat de orice factor care rupe legăturile implicate în menținerea structurii tridimensionale a unei proteine. Legăturile care determină structura terțiară sau cuaternară a unei proteine sunt în general legături slabe, și din acest motiv proteinele pot fi ușor denaturate. Conformația total dezorganizată a unei proteine complet denaturate se numește **conformație întâmplătoare („random coil”)**.

Denaturarea proteinelor poate fi **reversibilă** sau **irreversibilă**. Agenții care provoacă denaturarea proteinelor sunt de natură **fizică** (temperaturi de peste 60°C, agitare, raze X, radiații ultraviolete, ultrasunete) și **chimică** (acizi, baze, săruri ale metalelor grele, solvenți organici, agenți tensioactivi).

Consecințele denaturării sunt: pierderea activității biologice, diminuarea solubilității, creșterea numărului de grupări –SH libere, pierderea capacității de a se combina cu apa, modificarea vâscozității și a presiunii osmotice, creșterea susceptibilității la hidroliza enzimatică.

4.3.3. Determinarea experimentală a structurii tridimensionale a proteinelor

Cristalografia cu raze X. De la determinarea structurii mioglobinei în 1960, structura a mii de proteine a fost între timp determinată prin cristalografie cu raze X. Etapa cheie în acest proces îl constituie precipitarea proteinei în condițiile în care ea formează cristale regulate care difractă razele X. Acest lucru se poate realiza prin tratarea unor picături fine de soluție proteică cu diverse combinații de pH-uri și agenți de precipitare (săruri, polietilenglicol). O structură tridimensională detaliată poate fi dedusă combinând datele structurii primare cu modul de difracție a unui mănunchi monocromatic de raze X. Apariția unor algoritmi și programe computerizate au făcut ca interpretarea spectrelor de difracție să fie din ce în ce mai simplă; inconvenientul major rămâne greutatea de a obține proteina în stare cristalină. Există o serie de dovezi, printre care păstrarea proprietăților catalitice ale enzimelor, care sugerează ca structurile determinate prin cristalografie reflectă structura proteinelor din soluții. O metodă complementară cristalografiei cu raze X este **spectroscopia de rezonanță magnetică nucleară**.

Modelarea moleculară. Un instrument ajutător la determinările empirice de structură tridimensională a proteinelor este reprezentat de utilizarea tehnologiilor de calcul în modelarea moleculară. În prezent există două tipuri de tehnici de modelare. În prima, structura tridimensională a unei proteine este folosită ca punct de pornire în construirea unui model de structură tridimensională posibilă pentru o proteină omoloagă. În a doua, sunt utilizate programele soft pentru a manipula un model static furnizat de cristalografie. În astfel de programe se simulează schimbările conformaționale ce ar avea loc în diferite condiții (schimbări de pH, temperatură, tărie ionică, ligand). În paralel, oamenii de știință studiază și bazele de date ce conțin structuri cunoscute, în încercarea de a concepe un program soft care să prevadă conformația tridimensională a unei proteine direct din structura sa primară.

4.3.4. Boli neurologice cauzate de modificări în conformația proteinelor

Prionii. Encefalopatiile spongiforme transmisibile sau bolile prionilor sunt maladii neurodegenerative fatale caracterizate prin modificări spongiforme și pierderi ale funcțiilor neuronilor cauzate de depunerea unor agregate proteice insolubile (prioni) în celulele nervoase. Acest tip de maladii include boala Creutzfeldt-Jakob la oameni, căpierea la oi și encefalopatia spongiformă bovină la vaci (boala vacii nebune). Sursa și mecanismul transmiterii prionilor au fost multă vreme

necunoscute, mai ales că nu s-a putut identifica nici o genă virală sau bacteriană care să îi codifice. În momentul de față se crede că maladiile prionice sunt de fapt maladii ale conformațiilor proteice transmise pe calea alterării conformației, de unde și proprietățile fizice neobișnuite ale proteinelor endogene ale organismului bolnav. Proteina PrP, proteină umană înrudită cu prionii, este o glicoproteină codificată de o genă aflată pe cromozomul 20. În mod normal, este monomerică și bogată în zone α -helix. PrP^c este un tip de proteine prionice patologice ce pot servi ca inductori pentru modificările conformaționale ale PrP normale în PrP^{sc}. PrP^{sc} este bogată în structuri β -sheet cu multe catene hidrofobe provenite de la aminoacizii nepolari îndreptate spre faza apoasă, condiții în care mai multe molecule de PrP^{sc} se asociază puternic, formând agregate rezistente la acțiunea proteazelor. Deoarece un prion patologic sau o moleculă înrudită poate induce modificări conformaționale în lanț, bolile prionice se pot transmite prin intermediul strict al proteinei, fără implicarea moleculelor de ADN sau ARN.

Maladia Alzheimer. Caracteristica principală a maladiei Alzheimer o constituie replierea sau plierea incorectă a unei proteine cerebrale, numită β -amiloid. În timp ce cauzele maladiei rămân necunoscute, este clar că plăcile senile caracteristice și fasciculele neurofibrilare conțin agregate de β -amiloid, o polipeptidă de 4,3 kDa rezultată din clivarea de către o protează a unei proteine mai mari (proteina precursoră de amiloid). La pacienții cu maladie Alzheimer se observă o creștere semnificativă a nivelului de β -amiloid, această proteină suferind și modificări conformaționale de la forma bogată în α -helixuri la cea bogată în structuri β -sheet, devenind astfel capabile de autoagregare. Se pare că mediatorul acestei transformări conformaționale este apolipoproteina E.

4.3.5. Structura collagenului

Maturarea proteinelor de multe ori implică ruperea și/sau formarea de legături covalente, un proces numit **modificare posttranslațională**. Multe proteine sunt biosintetizate inițial ca precursori mai mari numiți **proproteine**. De multe ori segmentele proteice care dispar ulterior servesc inițial pentru orientarea proteinelor către anumite compartimente celulare sau facilitează transportul prin membranele celulare. În alte cazuri acestea au rolul de a inhiba activitatea potențial dăunătoare a unei proteine; astfel, proteaze de tipul tripsinei și chimotripsinei rămân inactive până când aceste proteine ajung la destinația finală, moment în care fragmentele protectoare sunt îndepărtate prin proteoliză selectivă. Alte modificări chimice pot avea loc adăugând noi funcționalități proteinei. Maturarea collagenului se face prin ambele aceste procese.

Colagenul este o proteină fibroasă. Colagenul este cea mai abundentă proteină fibroasă, reprezentând mai mult de 25% din masa proteică umană. Alte proteine fibroase sunt keratina și miozina. Aceste proteine reprezintă baza structurală a celulelor (citoscheletul) și a țesuturilor. Rezistența și elasticitatea pielii este dată de o rețea de fibre de colagen și keratină, în timp ce oasele și dinții au la bază o rețea de colagen asemănătoare armăturilor de oțel din betonul armat. Colagenul intră și în alcătuirea țesuturilor conjunctive (tendoane, cartilagii, ligamente). Marele grad de rezistență elastică a colagenului necesară pentru a duce la îndeplinire aceste roluri structurale derivă din secvențele repetate de aminoacizi și din structura secundară foarte regulată.

Moleculele de colagen formează un triplu helix. Tropocolagenul este alcătuit din trei fibre, fiecare având cca 1000 resturi de aminoacizi, împletite într-o conformație unică, numită triplu helix. O fibră matură de colagen are aspectul unui baston lung, cu un raport axial de aproximativ 200. Este alcătuită dintr-o împletitură de trei catene polipeptidice răsucite spre stânga. Această împletitură se răsucește spre dreapta pentru a forma triplul helix al colagenului. Sensurile opuse de răsucire al acestui super helix și al componentelor sale fac ca fibra de colagen să fie deosebit de rezistentă (același principiu se aplică la cablurile de susținere a podurilor suspendate).

-Gly-X-Y-Gly-X-Y-Gly-X-Y-Gly-X-Y-
Structura primară



Triplu helix de colagen

Figura 4.13. Structura colagenului.

Triplul helix al colagenului are 3,3 resturi de aminoacizi pe spirală. Grupările R din fiecare catenă sunt aranjate atât de compact, încât pentru a putea încăpea, fiecare al treilea aminoacid trebuie să fie o glicină. Colagenul este de asemenea bogat în prolină și hidroxiprolină, existând secvența repetitivă Gly-X-Y, în care Y este de obicei prolină sau hidroxiprolină. Triplul helix este stabilizat prin legături de hidrogen care se formează *intercatenar*. Grupările OH ale hidroxiprolinei de asemenea participă la formarea legăturilor de hidrogen intercatenare. Un plus de stabilitate este conferit de legături covalente încrucișate (atât intra cât și intercatenare) între resturi de lizină modificate chimic posttranslațional.

Colagenul este sintetizat sub forma unui precursor mare. Colagenul este sintetizat inițial sub forma unei polipeptide numită procologen, în care numeroase resturi prolin și lizil sunt hidroxilate de prolinhidrolază și lizilhidrolază, enzime care necesită acid ascorbic (vitamina C) pentru o bună funcționare. Resturile hidroxiprolil și hidroxilizil nou formate conferă un plus de stabilitate prin formarea unor noi legături de hidrogen. În plus, glucozil- și galactozil transferaze atașează resturi de glucoză sau galactoză la grupările hidroxi de la anumite resturi de hidroxilizină. Ulterior acestor transformări, partea centrală a procologenului se asociază cu alte molecule formând triplul helix. Acest proces este acompaniat de îndepărtarea prin proteoliză selectivă a părții globulare amino-terminale precum și a extensiilor carboxi-terminale. Anumite resturi lizil sunt modificate de lizil oxidază, o cupru-proteină care transformă gruparea ϵ -amino în grupare aldehydică. Aceste grupări aldehydice se condensează cu grupările ϵ -amino ale lizinelor nemodificate, formând baze Schiff (en-imine) care sunt ulterior reduse, cu formare de legături simple C-N. Aceste legături covalente leagă încrucișat catenele polipeptidice, conferind fibrei de colagen o extraordinară rezistență și rigiditate.

4.3.6. Anumite insuficiențe genetice și nutriționale perturbă maturarea colagenului.

Cel mai bine cunoscut defect în biosinteza colagenului este scorbutul, care este provocat de lipsa vitaminei C din alimentație. Această carență perturbă buna funcționare a prolin- și lizilhidrolazelor. Rezultă un deficit în numărul resturilor de hidroxiprolină și hidroxilizină care subminează stabilitatea conformațională a fibrelor de colagen, ducând la sângerarea gingiilor, umflarea încheieturilor, nevindecarea rănilor, și în cele din urmă la moarte. Sindromul Menkes, caracterizat prin retardarea creșterii, reflectă o deficiență de cupru în alimentație, care duce la o proastă funcționare a liziloxidazei, care catalizează o reacție cheie în procesul de formare a legăturilor încrucișate ce contribuie la rezistența fibrei de colagen.

Deficiențe genetice în biosinteza colagenului includ câteva forme de osteogeneză imperfectă caracterizate prin fragilitatea oaselor. În sindromul Ehlers-Dahlos, un grup de boli ale țesutului conjunctiv, apar defecte în genele care codifică procologen-N-peptidaza sau lizilhidrolaza, defecte care provoacă anormalități ale pielii și fragilizări ale încheieturilor.

5. Enzime. Mecanism de Acțiune

Enzimele sunt biopolimeri care catalizează reacțiile chimice care fac posibilă viața așa cum o știm. Existența și menținerea a unui set de enzime complet și echilibrat sunt esențiale pentru: metabolizarea nutrienților în vederea obținerii de energie și de o serie întreagă de metaboliți cheie; pentru asamblarea proteinelor, acizilor nucleici, membranelor, celulelor și țesuturilor; pentru utilizarea energiei în motilitatea celulară și contracția musculară. Cu excepția câtorva reacții care sunt catalizate de ARN (ribozime) vasta majoritate a enzimelor sunt proteine. Deficiențe în cantitatea sau activitatea catalitică a unor enzime cheie pot fi cauzate de defecte genetice, carențe nutriționale sau fenomene toxice. Enzime nefuncționale pot apărea ca urmare a unor defecte genetice sau a unor infecții virale și bacteriene. Cercetarea medicală urmărește rezolvarea dezechilibrelor în activitățile enzimatică prin utilizarea unor agenți farmacologici care inhibă activitatea unor enzime, sau prin terapie la nivel de gene care să repare deficiențele de funcționare a enzimelor.

Enzimele sunt biocatalizatori care catalizează conversia unuia sau mai multor compuși (**substrat enzimatic**) în unul sau mai mulți compuși diferiți (**produși**), măbind viteza reacției corespunzătoare necatalizate cu factori de cel puțin 10^6 . Ca toți catalizatorii, enzimele nu sunt consumate în timpul reacției și nici nu suferă modificări permanente.

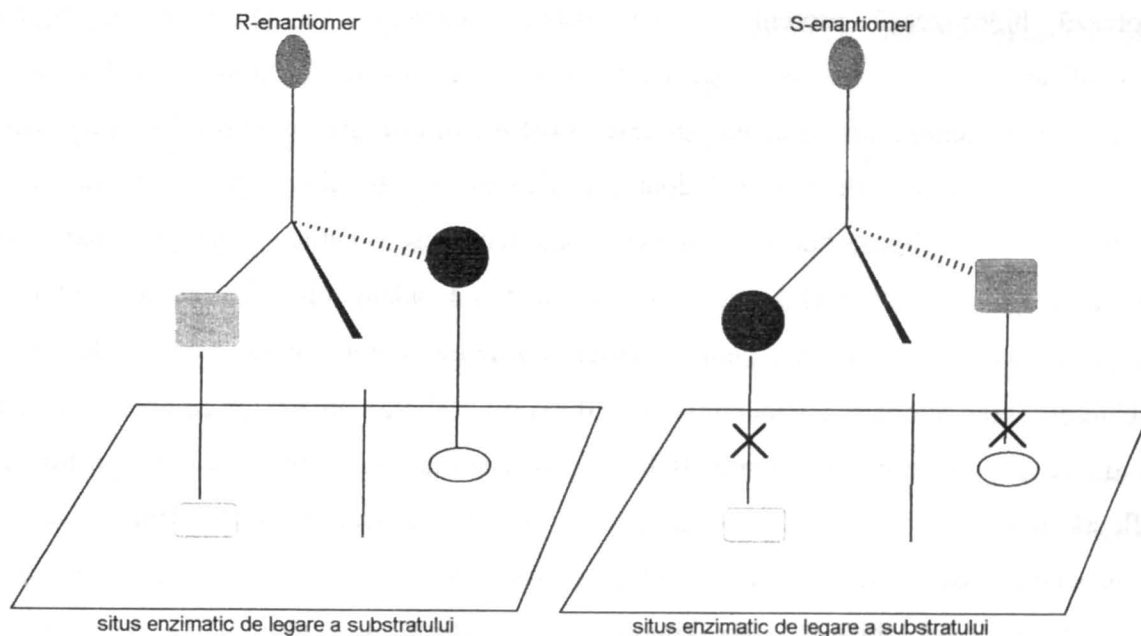


Figura 5.1. Reprezentare schematică a unui situs enzimatic de legare a substratului. Un enantiomer al substratului se potrivește steric cu situsul enzimatic, pe când celălalt, nu.

În afara faptului ca sunt deosebit de eficiente, enzimele sunt și catalizatori de înaltă selectivitate. Spre deosebire de catalizatorii utilizați în industria chimică, enzimele sunt specifice nu numai pentru tipul de reacție catalizat, ci și pentru substrat, astfel încât o enzimă va cataliza transformarea unui *singur substrat* sau a unei *clase restrânse de substraturi înrudite*. Enzimele sunt catalizatori stereospecfici, și de regulă catalizează transformarea exclusivă a unui stereoizomer – de exemplu D-glucid și nu L-glucid, L- aminoacid și nu D-aminoacid. Enzimele leagă un substrat prin *cel puțin trei puncte de legătură*; din această cauză ele pot transforma chiar și un compus achiral într-un compus chiral. Specificitatea pronunțată și nuanțată a enzimelor conferă organismelor capacitatea de a conduce și de a controla independent un larg spectru de reacții biochimice.

5.1. Clasificarea enzimelor

Găsirea unui sistem de nomenclatură a enzimelor care să fie în același timp cuprinzător, ușor de înțeles și ușor de folosit s-a dovedit a fi o sarcină deosebit de dificilă pentru specialiști. Numele obișnuit pentru majoritatea enzimelor derivă din caracteristica lor esențială: capacitatea de a cataliza o anumită reacție biochimică. În general, numele unei enzime constă dintr-un termen care indică tipul de reacție catalizat, urmat de sufixul **-ază**. De exemplu, o **hidrogenază** îndepărtează atomi de hidrogen, o **protează** hidrolizează proteine, o **izomerază** catalizează rearanjări ale configurației. Pentru particulizare, în fața unui astfel de nume se adaugă numele substratului pentru care enzima este specifică (de exemplu **lactat dehidrogenază**, **xantin oxidază**, **glucozo-6-fosfat izomerază**, etc.). Există și multe denumiri triviale care însă doar specifică sursa enzimei (ribonuclează pancreatică), specifică modul de reglare (lipaza hormon-sensibilă), sau denumesc o caracteristică principală a mecanismului de acțiune (cistein-protează). La aceste nume uneori s-au adăugat indici alfanumerici (ARN-polimeraza III, protein kinaza C β). Pentru a elimina orice confuzie sau ambiguitate, Comisia de Enzimologie (EC) a Uniunii Internaționale a Biochimicilor (IUB) au elaborat un sistem complex, dar neambiguu, de denumire a enzimelor. În sistemul IUB, fiecare enzimă are un nume și un cod numeric unic, care reflectă atât tipul de reacție catalizat cât și tipul de substrat implicat. Conform acestui sistem de nomenclatură, enzimele sunt grupate în șase clase, fiecare cu câteva subclase. De exemplu, enzima denumită în mod obișnuit „hexokinază” este conform sistemului IUB „ATP:D-hexozo-6-fosfat-transferază, E. C. 2.7.1.1”. Acest nume indică faptul că hexokinaza este un membru al clasei 2 (transferaze, prima cifră din cod), subclasa 7 (transfer al unei grupări fosfat, a doua cifră), sub-subclasa 1 (acceptorul de fosfat este o grupare OH, a treia cifră). Cifra a patra din cod indică poziția pe care o are o enzimă în sub-subclasa respectivă. Termenul „hexozo-6” indică faptul că gruparea OH unde se face transferul grupării fosfat este legat de carbonul 6 al unei hexoze.

Clasele de enzime sunt următoarele:

1. **Oxidoreductazele** catalizează reacții de oxidare și de reducere.
2. **Transferazele** catalizează transferul unor grupări (metil, glicozil) de la un donator la un acceptor.
3. **Hidrolazele** catalizează ruperea hidrolitică a legăturilor C-C, C-O, C-N, P-O sau ale altor legături.
4. **Liazele** catalizează ruperea legăturilor C-C, C-O, C-N și a altor legături, inclusiv eliminări (cu formare de legături duble), sau adiții (ruperea legăturii π).
5. **Izomerasele** catalizează schimbările structurale sau geometrice dintr-o moleculă.
6. **Ligazele** catalizează unirea a două molecule, de obicei cuplate cu hidroliza unei grupări fosfat dintr-o moleculă de ATP sau alt nucleozidtrifosfat.

În ciuda avantajelor oferite de sistemul de clasificare IUB, în literatură continuă să se folosească cu predilecție denumirile triviale ale enzimelor.

5.2. Grupări prostetice, cofactori și coenzime

Multe enzime conțin molecule mici neproteice sau ioni metalici care participă direct la legarea substratului sau la procesul catalitic. Aceste componente neproteice, numite **grupări prostetice**, **cofactori** sau **coenzime** măresc posibilitățile catalitice ale unei enzime.

Grupările prostetice se caracterizează prin faptul că sunt incorporate strâns în structura unei enzime prin legături covalente sau necovalente. Exemple de grupări prostetice sunt piridoxal fosfatul, flavin mononucleotidul (FMN), flavin dinucleotidul (FAD), tiamin pirofosfatul, biotina, ca și ioni metalici ai Co, Cu, Mg, Mn, Se și Zn. Ionii metalici sunt cele mai întâlnite grupări prostetice. Enzimele care conțin ion metalic strâns legați în structura lor se numesc **metaloenzime**. Mulți ioni metalici care intră în alcătuirea metaloenzimelor sunt complexați de grupări prostetice de tipul hemului sau grupări Fe-S. Ionii metalici pot facilita legarea și orientarea spațială a substratelor, formarea legăturilor cu intermediarii de reacție (Co^{2+} în vitamina B_{12}) sau interacția cu substratul pentru a-l face mai electrophil sau mai nucleofil.

Cofactorii au funcții similare grupărilor prostetice, doar că ei se leagă de într-o manieră tranzitorie, dissociabilă de enzimă sau de un substrat cum ar fi ATP. Pentru ca reacția enzimatică să aibă loc, cofactorii trebuie să fie prezenți în mediul care înconjoară enzima. Cei mai obișnuiți cofactori sunt reprezentați de ioni metalici. Enzimele care au nevoie de un cofactor metalic pentru a fi active sunt denumite **enzime activate de metale** pentru a le distinge de metaloenzime, în care ionul metalic este grupare prostetică.

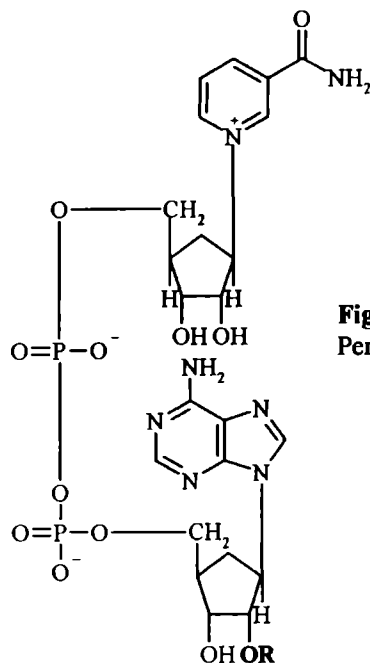


Fig. 5.2. Structura NAD^+ și NADP^+ .
Pentru NAD^+ , $\text{R} = \text{H}$. Pentru NADP^+ , $\text{R} = \text{PO}_3^{2-}$

Coenzimele servesc pe post de „navete reciclabile” sau „agenți transportori de grupări”. Ele transportă multe substraturi de la punctul lor de formare la punctul lor de utilizare. Asocierea cu o coenzimă duce la stabilizarea unui substrat, cum ar fi ionii de hidrogen sau hidrură, instabili în mediul apos din celulă. Alte specii chimice transportate de coenzime sunt grupări metil (transportate de acizii folici), acil (coenzima A), oligozaharide (dolicol), etc.

O serie de coenzime, cofactori și grupări prostetice sunt derivați ai **vitaminelor B**. În plus, multe coenzime conțin resturile de adenină, riboză și fosfat ale AMP sau ADP. **Nicotinamida** și **riboflavina** sunt componente ale coenzimelor redox NAD^+ și NADP^+ , respectiv FMN și FAD. **Acidul pantotenic** este un fragment al transportorului de grupări acil, **coenzima A**. Sub formă de pirofosfat, **tiamina** participă la decarboxilarea α -cetoacizilor, iar coenzimele **acid folic** și **cobamida** funcționează în metabolismul grupărilor cu un atom de carbon (vezi capitolul 8).

5.3. Situsul activ

Extraordinara specificitate de substrat și marea eficiență catalitică a enzimelor reflectă existența unei conformații croită special pentru o singură reacție. Această conformație, numită **situs activ**, are de regulă forma unui buzunar sau a unei cavități. Situsul activ al enzimelor oligomere este situat de multe ori la interfața dintre protomeri și implică aminoacizi de la mai mult de un protomer.

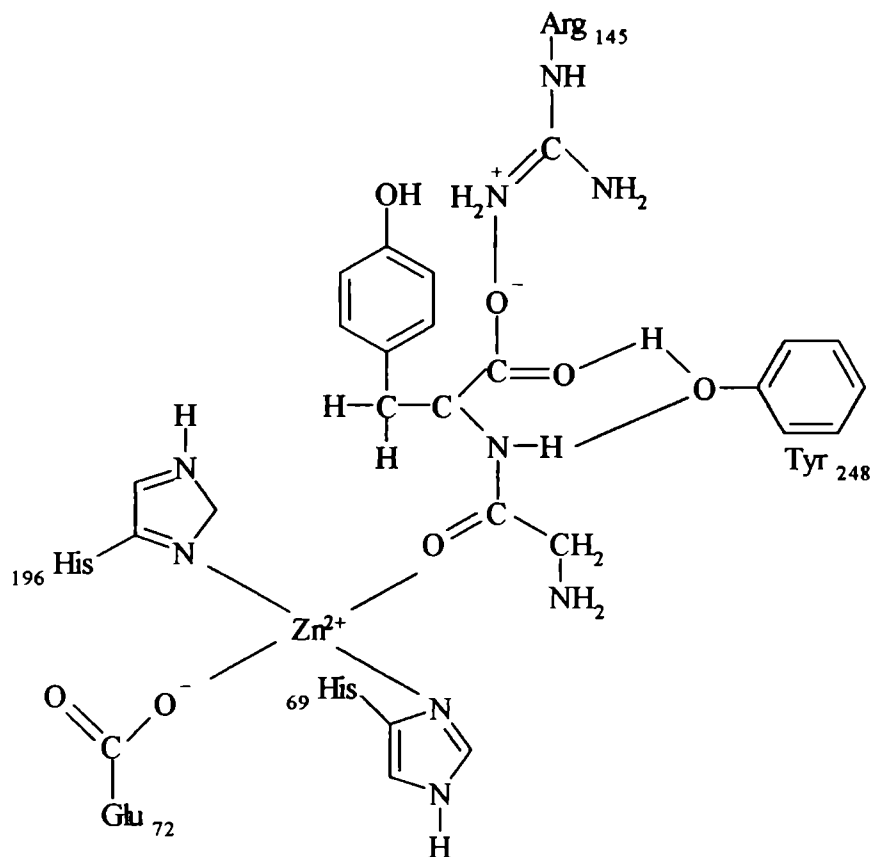


Figura 5.3. Reprezentarea bidimensională a unui substrat dipeptidic. glicil-tirozina, legat în situsul activ al carboxipeptidazei A

Situsul activ are o anumită conformație tridimensională care are două roluri: adăpostește substratul și facilitează cataliza. Substratul se leagă de situsul activ al enzimei prin intermediul unei *parți complementare cu situsul enzimatic care nu suferă transformări în timpul reacției* și care simultan aliniază partea substratului care va fi aranjat într-o orientare favorabilă transformării. În același timp, situsul activ leagă și orientează gruparea postetică. Acolo unde este cazul, anumite resturi aminoacil din lanțul peptidic al enzimei contribuie la mărimea și caracterul tridimensional al situsului activ.

5.4. Mecanismele catalizei enzimaticе

Enzimele utilizează mecanisme multiple pentru a facilita cataliza reacțiilor biochimice. În mare, există patru mecanisme care ilustrează capacitatea enzimelor de a realiza creșteri dramatice ale vitezei reacțiilor biochimice.

Cataliza prin proximitate

Pentru ca moleculele să reacționeze, ele trebuie să se apropie la distanțe de ordinul lungimilor legăturilor chimice. Cu cât concentrația reactanților este mai mare, cu atât moleculele lor se vor ciocni mai frecvent și deci viteza de reacție va fi mare. Când o enzimă leagă o moleculă de substrat în situsul său activ, ea creează o regiune cu o concentrație locală mare de substrat, în același timp făcând posibilă și o orientare spațială a moleculelor favorabilă interacțiilor chimice. În acest fel, viteza de reacție poate crește de peste o mie de ori.

Cataliza acido-bazică

Grupările ionizabile ale anumitor aminoacizi din situsul activ și - atunci când este cazul - grupările ionizabile ale grupării prostetice contribuie la cataliză ca acizi sau baze. Cataliza acido-bazică poate fi atât specifică, cât și generală. Prin „specifică” se înțelege cataliză numai prin intermediul H_3O^+ și HO^- . În **cataliza specific acidă** sau **cataliza specific bazică**, viteza de reacție depinde de modificări ale concentrațiilor ionilor H_3O^+ independent de concentrațiile altor acizi (donori de protoni) sau baze (acceptori de protoni) prezenți în soluție sau în situsul activ. În **cataliza general acidă** sau **cataliza general bazică** viteza de reacție este influențată de *toți* acizii și bazele prezente.

Cataliza prin constrângere.

Enzimele care catalizează reacțiile litice, care presupun ruperea unei legături covalente, de regulă leagă substratul într-o conformație ușor defavorabilă pentru legătura care va suferi clivarea. Rezultă o tensiune care întinde sau distorsionează legătura țintă, slăbind-o și făcând-o vulnerabilă la rupere.

Cataliza covalentă

Procesul de **cataliză covalentă** presupune formarea unei legături covalente între enzimă și substraturi, după care enzima modificată devine reactant. Cataliza covalentă introduce o cale nouă de reacție care este mai favorabilă energetic, și deci mai rapidă decât reacția necatalizată. Această modificare covalentă a enzimei este însă tranzitorie și la terminarea reacției enzima revine la starea inițială, rolul său rămânând catalitic. Cataliza covalentă reprezintă mecanismul cel mai des întâlnit în cazul reacțiilor care presupun transferuri de grupări funcționale. Aminoacizii care participă la cataliza covalentă sunt de regulă cisteina, serina și ocazional, histidina. De multe ori, cataliza covalentă se face printr-un mecanism „ping-pong”, în care primul substrat este legat și produsul său eliberat înainte de legarea celui de-al doilea substrat.

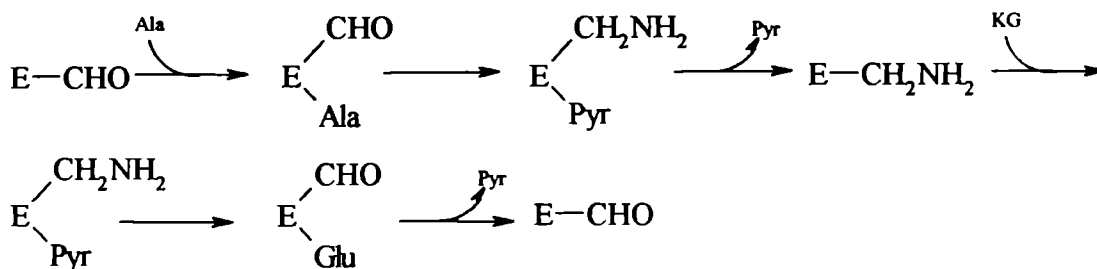


Figura 5.4. Mecanism ping-pong în cazul transaminării. E-CHO și E-CH₂NH₂ reprezintă complexe enzimă-piridoxalfosfat, respectiv enzimă-piridoxamină. Ala = alanină, Pyr = piruvat, KG = α-cetoglutarat, Glu = glutamat.

La începutul secolului trecut, Emil Fischer a comparat înalta specificitate enzimă-substrat cu relația lacăt-cheie. Modelul „lacăt –cheie” explică foarte bine înalta specificitate a reacțiilor enzimă-substrat, dar nu poate explica schimbările dinamice care însoțesc procesul catalitic. Acest neajuns a fost îndepărtat de Daniel Koshland, care a elaborat **modelul potrivirii induse**. Acest model postulează că atunci când substraturile se apropie și se leagă de enzimă induce o modificare conformațională analogă introducerii mâinii (substratul) într-o mână (enzimă). Un corolar al acestui model afirmă că enzima induce schimbări reciproce în substraturi, utilizând energia eliberată în timpul legării pentru a facilita transformarea substratului în produși. Modelul potrivirii induse a fost confirmat de studii biofizice asupra motilității enzimelor în timpul legării de substrat.

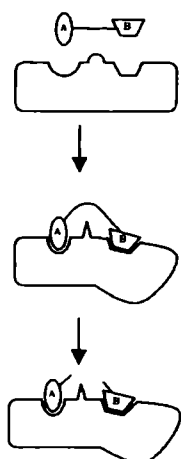


Figura 5.5. Reprezentare bidimensională a modelului lui Koshland de „potrivire indusă”. Legarea substratului A-B induce schimbări conformaționale în structura enzimei care la rândul ei orientează grupările care participă la cataliză și tensionează legătura dintre A și B, facilitând clivarea.

Un exemplu de enzimă care acționează prin cataliză acido-bazică îl constituie aspartic proteazele. **Familia aspartiat proteazelor** include enzime digestive precum pepsina, cathepsina lizozomală și proteaza produsă de virusul imunodeficienței umane, HIV. Aceste enzime au un mecanism catalitic comun. Procesul catalitic implică două resturi aspartil conservate la toți reprezentanții clasei și care joacă rol de catalizator acido-bazic. În prima etapă a reacției, o grupare aspartat care funcționează pe post de bază (Asp X) extrage un proton de la o moleculă de apă, crescându-i astfel nucleofilicitatea. Acest nucleofil atacă atomul de carbon carbonilic a legăturii peptidice care urmează să fie hidrolizată, formând un **intermediar tetraedric** (stare de tranziție).

Al doilea aspartat (Asp Y) facilitează apoi descompunerea acestui intermediar tetraedric donând un proton grupării amino produsă prin ruperea legăturii peptidice. În acest exemplu, două resturi aspartat acționează una ca acid, cealaltă ca bază. Acest lucru se datorează vecinătăților imediate ale celor două resturi aspartat, care favorizează ionizarea unuia, dar nu și al celuilalt (Figura 5.6).

Un exemplu de enzime care acționează prin cataliză acido-bazică îl constituie chimotripsina. În timp ce aspartat proteazele acționează hidrolitic prin atacul direct al apei asupra legăturii peptidice, chimotripsina (care este o **serin protează**) formează un complex intermediar covalent acil-enzimă. Un rest seril hiperreactiv (Ser 195) participă la formarea unei rețele cu un rest histidil (His 57) și unul aspartil (Asp 102). Deși îndepărtate în structura primară, aceste resturi aminoacil se găsesc foarte apropiate în situsul activ al enzimei (la distanțe de ordinul unei legături covalente). Ele se află aliniate în ordinea Asp 102-His 57-Ser 195 și constituie un „sistem-ștafetă de sarcină” care funcționează ca o „navetă protonică” (Figura 5.7).

Legarea substratului inițiază deplasări protonice care duc la transferul protonului hidroxic de la Ser 195 la Asp 102. Nucleofilicitatea crescută a oxigenului serilic determină atacul său asupra atomului de carbon carbonilic din legătura peptidică din substrat, cu formarea unui intermediar acil-enzimă. Hidrogenul de la Asp 102 este apoi transferat via His 57 la gruparea amino care este pusă în libertate la ruperea legăturii peptidice. Fragmentul peptidic nou format cu gruparea amino liberă părăsește situsul activ, fiind înlocuit de o moleculă de apă. Rețeaua-ștafetă acționează acum asupra moleculei de apă prin extragerea unui proton spre His 57 și Asp 102. Ionul hidroxid astfel format atacă intermediarul acil-enzimă, iar o navetă protonică inversată înapoiază protonul la Ser 195, cu refacerea stării inițiale. Deși se modifică în timpul catalizei, chimotripsina se regăsește neschimbată la sfârșitul reacției. Tripsina și elastaza folosesc un mecanism asemănător de cataliză, numai că numărul recturilor aminoacil din naveta protonică Ser-His-Asp este diferit.

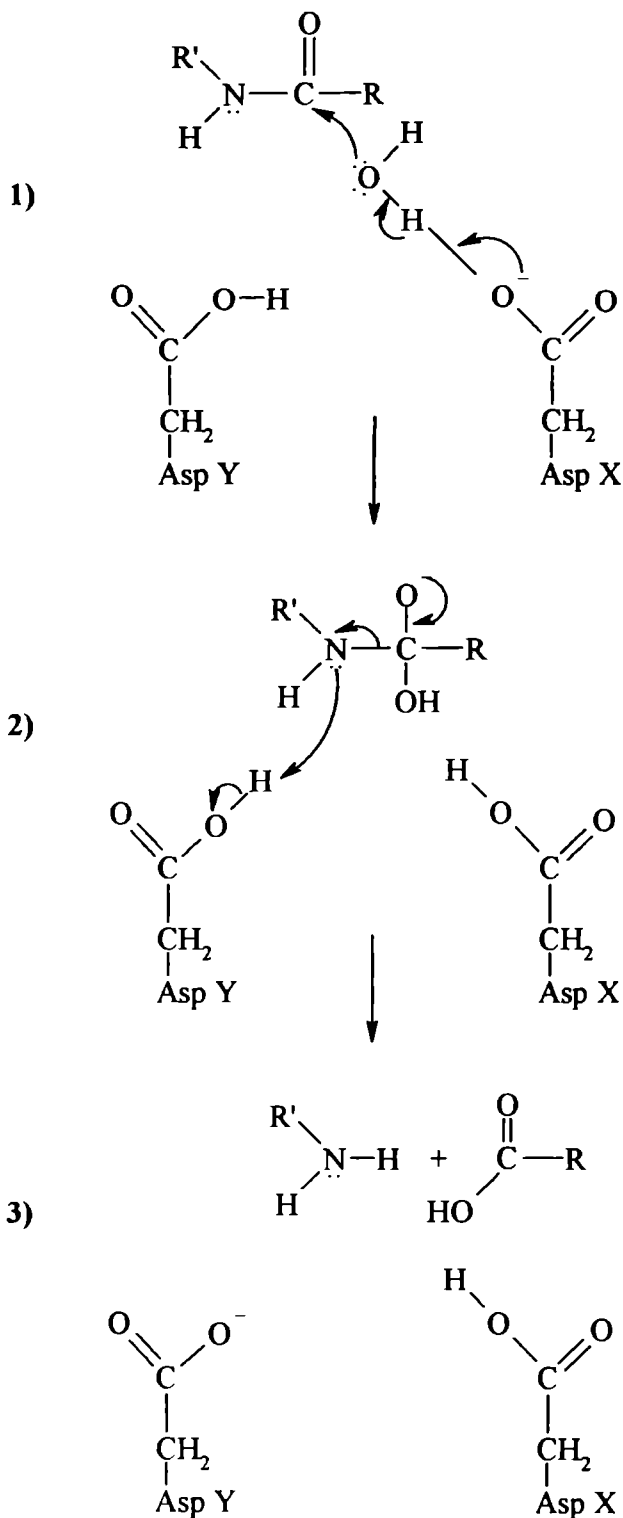


Figura 5.6. Mecanismul de acțiune al unei aspartat proteaze. Săgețile curbe indică sensul de deplasărilor electronice. 1) Restul Asp X joacă rol de bază și activează o moleculă de apă extrăgându-i un proton. 2) Molecula de apă activată atacă legătura peptidică, formând un intermediar tetraedric. 3) Restul AspY joacă rol de acid facilitând ruperea intermediarului tetraedric prin cedarea unui proton grupării amino nou formate. Migrarea ulterioară a protonului de la Asp X la AspY readuce proteaza la starea inițială.

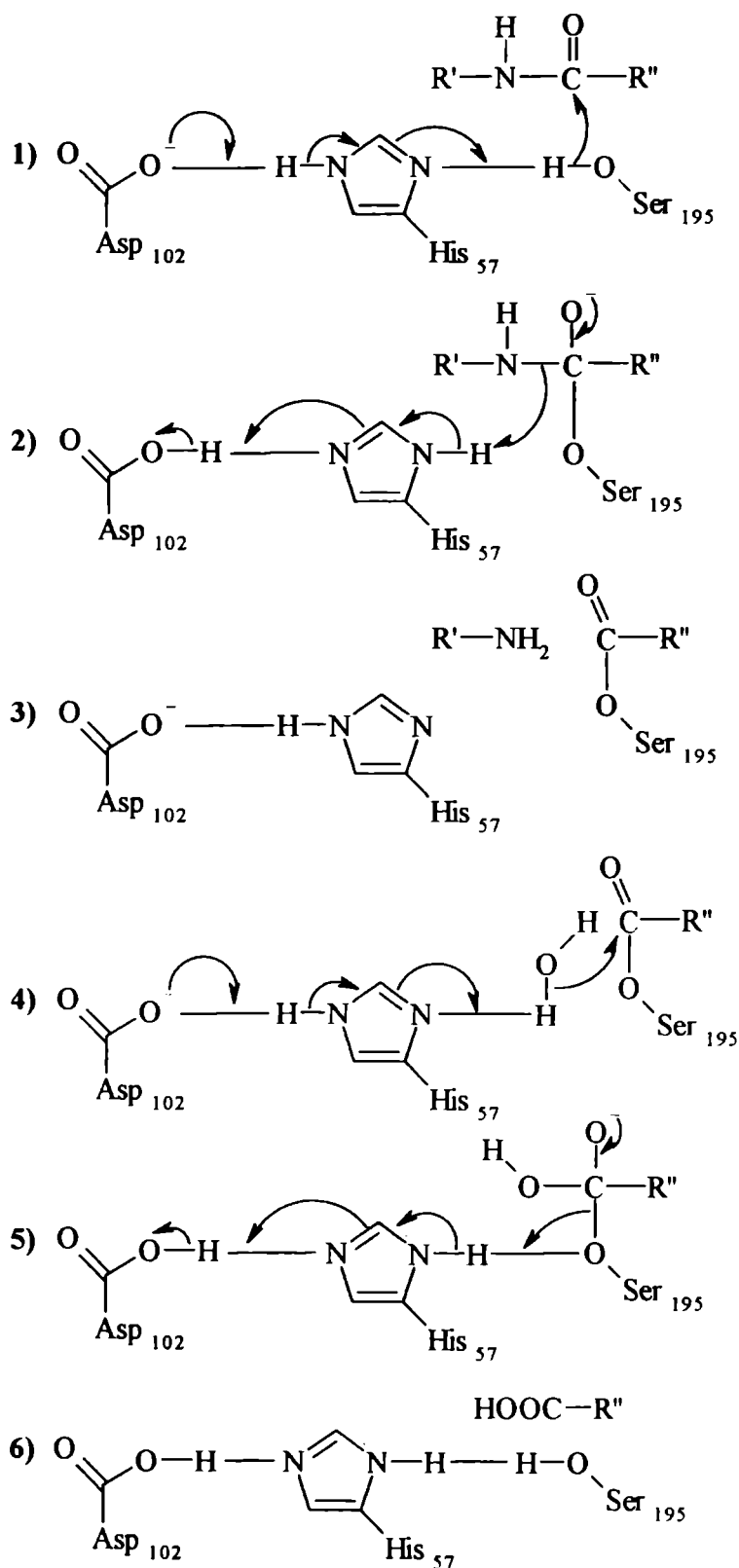


Figura 5.7. Mecanismul catalitic al chimotripsinei.

1) Sistemul-șafetă de sarcină preia un proton de la Ser 195, transformând-o într-un nucleofil puternic. 2) Ser 195 activată atacă legătura peptidică, formând un intermediar tetraedric. 3) Eliberarea peptidei amino-terminale este facilitată de cedarea unui proton grupării amino nou-formate de către His 57, cu obținerea unui intermediar acil-Ser 195. 4) His 57 și Asp 102 colaborează în procesul de activare a unei molecule de apă, care atacă complexul acil-Ser 195, formând un al doilea intermediar tetraedric. 5) Sistemul-șafetă de sarcină cedează un proton restului Ser 195, facilitând 6) ruperea intermediarului tetraedric și eliberarea peptidei carboxi-terminale.

Membrii unei familii de enzime, cum ar fi aspartat sau serin proteazele folosesc un mecanism similar pentru a cataliza o reacție comună, doar că acționează asupra unor substraturi diferite. Aceste familii de enzime se pare ca au apărut datorită unor fenomene de duplicare a unei gene, care au creat o copie a genei care codifică o anumită enzimă. Proteinele codificate de cele două gene pot evolua independent ajungând să recunoască substraturi diferite. În acest fel au evoluat de exemplu chimotripsina, care scindează legături peptidice pe partea carboxi a resturilor de aminoacil aromatice, și tripsina, care scindează legături peptidice pe partea carboxi a resturilor de aminoacil bazice. Faptul că cele două enzime au un strămoș comun poate fi dedus din faptul că cele două enzime au anumiți aminoacizi comuni, în aceleași poziții (Tabelul 5.1). Astfel de resturi aminoacil sunt **conservate**.

Tabelul 5.1. Secvența din vecinătățile situsurilor catalitice ale unor serin proteaze.
Regiunile arătate sunt situate de o parte și de alta a resturilor Ser și His din situsul catalitic.

Enzimă	Secvența din jurul serinei [S]	Secvența din jurul histidinei [H]
Tripsină	DSCQDG[S]GGPVVCSGK	VVSAA[H]CYKSG
Chimotripsină A	SSCMGD[S]GGPLVCKKN	VVTAA[H]GGVTT
Chimotripsină B	SSCMGD[S]GGPLVCQKN	VVTAA[H]CGVTT
Trombină	DACEGD[S]GGPFVMKSP	VLTA[A][H]CLLYP

Proteinele care prezintă un număr mare de resturi aminoacil conservate sunt considerate **omoloage**. În Tabelul 5.1 sunt prezentate regiunile de omologie ale unor serin proteaze. Printre resturile aminoacil conservate se numără cele care participă direct la cataliză.

Organismele superioare prezintă uneori câteva versiuni distincte ale unei anumite enzime, fiecare catalizând aceeași reacție. Aceste forme se numesc **izoenzime** și ca și membrii unei familii enzimatică rezultă din duplicarea unor gene. Izoenzimele pot prezenta diferențe ale proprietăților, cum ar fi sensibilitatea la anumiți factori reglatori sau afinitatea față de substrat (de exemplu hexokinaza și glucokinaza). Aceste diferențe le conferă specificitate de țesut sau de circumstanțe. Unele izoenzime măresc șansele de supraviețuire, servind ca „rezerve” pentru enzimele vitale.

5.5. Determinarea activității enzimatică

Enzimele se găsesc în celule în cantități infime, lucru care complică determinarea prezenței și concentrației lor celulare. Din fericire, capacitatea lor de a transforma rapid mii de molecule de substrat

în produșii de reacție poate fi folosită în scopul detectării lor. Metodele de determinare a activității enzimatică sunt deseori utilizate în cercetare și în laboratoarele clinice. În anumite condiții, viteza reacției urmărite este proporțională cu cantitatea de enzimă prezentă în mediul de reacție, lucru care poate permite determinarea concentrației unei enzime.

Metoda ELISA

Sensibilitatea reacțiilor enzimatică poate fi exploatată în scopul determinării proteinelor care nu prezintă activitate enzimatică. Metoda ELISA (Enzyme-Linked Immuno Assay) utilizează anticorpi legați de o „enzimă raportoare” cum ar fi fosfataza alcalină sau peroxidaza din hrean, enzime ai căror produși de reacție pot fi ușor determinați. Când seruri sau alte probe sunt plasate într-o plăcuță de microtitrare din plastic, proteinele aderă la suprafața de plastic și sunt astfel imobilizate. Zonele neocupate de proteina de interes sunt blocate cu o proteină neantigenică (neutră), cum ar fi albumina serică bovină. Se adaugă apoi o soluție de anticorpi specifici pentru proteina de interes cuplați covalent cu „enzima raportoare”. Anticorpii reacționează specific cu antigenul (proteina de interes) și devin la rândul lor imobilizați. Excesul de anticorpi liberi este îndepărtat prin spălare, după care prezența și cantitatea de anticorp legat se determină prin adăugarea substratului specific „enzimei raportoare”.

Determinarea spectrofotometrică a activității enzimatică

Proprietățile fizico-chimice ale reactanților în reacțiile catalizate enzimatic dictează în principal modul de determinare a activității enzimelor. Metoda spectrofotometrică se folosește de capacitatea unui substrat sau produs de reacție de a absorbi lumină de o anumită lungime de undă. Activitatea dehidrogenazelor NAD(P)^+ -dependente se poate determina spectrofotometric deoarece formele reduse ale coenzimelor lor, NADH și NADPH absorb lumina la 340 nm, în timp ce formele lor oxidate NAD^+ și respectiv NADP^+ , nu. Când NAD(P)^+ este redus, absorbanta la 340 nm crește în funcție de viteza de formare a NAD(P)H . Invers, pentru o dehidrogenază care catalizează oxidarea NAD(P)H , se va observa o descreștere a absorbantei la 340 nm. În fiecare caz, viteza de modificare a densității optice la 340 nm va fi proporțională cu activitatea enzimatică.

Determinarea enzimelor a căror reacții nu sunt însoțite de schimbări în absorbantă sau fluorescență este în general mai greu de realizat. În unele cazuri, substratul sau produsul de reacție poate fi transformat într-un compus mai ușor de determinat. În alte cazuri, produsul de reacție trebuie separat de substratul nereacționat, înaintea măsurătorii – un proces facilitat de utilizarea substraturilor radioactive. O strategie alternativă recurge la substraturi sintetice care dau produși ce absorb lumina de o anumită lungime de undă. De exemplu, *p*-nitrofenilfosfatul este un substrat artificial pentru unele

fosfataze. *p*-Nitrofenilfosfatul nu absoarbe lumină, pe când produsul reacției de hidroliză, ionul *p*-nitrofenolat, absoarbe lumină la 419 nm.

O altă metodă de interes general constă în utilizarea unei „metode de cuplare”. De regulă, se lucrează cu un exces dintr-o dehidrogenază al cărei substrat este produsul enzimei de interes. Viteza de apariție (dispariție) a NAD(P)H apoi depinde de viteza reacției enzimatică cu care dehidrogenaza a fost cuplată.

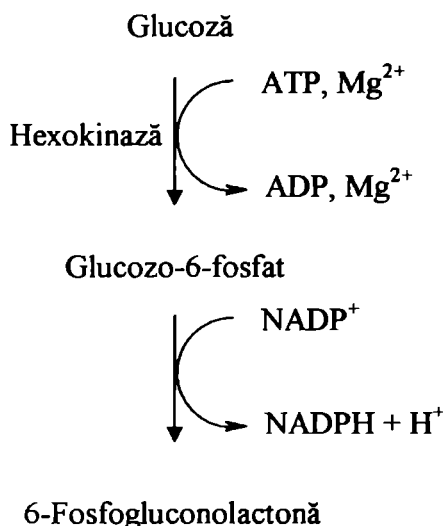


Figura 5.8. Determinarea activității hexokinazei prin metoda cuplării. Producerea glucozo-6-fosfatului în reacția catalizată de hexokinază este cuplată cu oxidarea acestui produs de către glucozo-6-fosfat dehidrogenază în prezența NADP⁺. Când glucozo-6-fosfat dehidrogenaza este prezentă în exces, viteza de formare a NADPH, detectată la 340 nm, este guvernată de viteza de formare a glucozo-6-fosfatului în reacția catalizată de hexokinază.

5.6. Utilizarea enzimelor în stabilirea diagnosticului clinic

Dintre miile de enzime existente în organismul uman, cele care îndeplinesc funcții indispensabile vieții celulare sunt prezente în toate țesuturile din organism. Alte enzime sau izoenzime sunt exprimate specific în anumite tipuri de celule, și numai în anumite perioade de dezvoltare, sau numai ca răspuns la anumite modificări fiziologice sau patologice. Analiza prezenței și distribuției enzimelor și izoenzimelor a căror expresie este în mod normal dependentă de țesut, perioadă de dezvoltare sau alte circumstanțe, constituie un instrument foarte folositor în stabilirea unui diagnostic clinic.

Anumite enzime sau proenzime, ca și substraturile lor, sunt prezente continuu în sistemul circulator al indivizilor normali executând funcții fiziologice la nivel sangvin. Aceste **enzime funcționale plasmatice** includ lipazele, pseudocolinesterazele și proenzimele necesare coagulării sângelui sau dizolvării cheagului. Majoritatea acestor enzime sunt sintetizate în ficat.

Plasma sangvină conține și alte enzime care nu execută nici o funcție în sânge. Aceste **enzime plasmatice nonfuncționale** rezultă din liza normală a eritrocitelor, leucocitelor sau a altor celule.

Distrugerii tisulare sau necroze cauzate de traume sau boli sunt în general însoțite de creșterea nivelului în plasma sangvină a unor enzime plasmatiche nonfuncționale. Tabelul 5.2 prezintă câteva enzime utilizate în enzimologia diagnostică.

Tabelul 5.2. Principalele enzime serice utilizate în diagnosticul clinic. Multe din enzimele prezentate nu sunt specifice numai pentru boala respectivă.

Enzima serică	Utilitatea diagnostică
Aminotransferaze Aspartat aminotransferază (AST sau sGOT) Alanin aminotransferază (ALT sau sGPT)	Infarct miocardic Hepatită virală
Amilază	Pancreatită acută
Ceruloplasmină	Degenerare hepato-lenticulară (maladia Wilson)
Creatin kinază	Disfuncții musculare și infarct miocardic
γ -Glutamil transpeptidază	Boli hepatice
Lactat dehidrogenază (izoenzime)	Infarct miocardic
Lipază	Pancreatită acută
Fosfataza acidă	Carcinom de prostată metastatic
Fosfataza alcalină (izoenzime)	Diferite disfuncții osoase, boli hepatice obstructive

L-Lactat dehidrogenaza (LDH) este o enzimă tetramerică a cărei protomeri sunt de două feluri H (de la *heart*, „inimă” în engleză) și M (de la *muscle*, „mușchi” în engleză). Protomerii se pot combina în felul arătat mai jos, rezultând izoenzime catalitic active:

Izoenzime LDH

I₁

I₂

I₃

I₄

I₅

Subunități

HHHH

HHHM

HHMM

HMMM

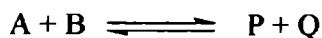
MMMM

Subunitățile H și M sunt codificate de două gene distincte, a căror expresie este reglată diferențiat în funcție de țesut. Izoenzima I₁ predomină în inimă, deoarece la acest nivel este exprimată gena H aproape exclusiv. Izoenzima I₅ predomină în ficat. În mod normal, nivelul LDH în plasma sangvină este foarte mic. În urma unui infarct miocardic sau a unei boli hepatice, țesutul afectat eliberează în sânge izoformele caracteristice. Creșterea nivelului de I₁ sau I₂ în sânge poate fi determinată prin separare electroforetică urmată de o măsurare a activității enzimaticе.

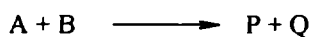
5.7. Cinetica enzimatică

Cinetica enzimatică este o parte a biochimiei care studiază modurile de determinare cantitativă a vitezei reacțiilor catalizate enzimatic precum și factorii care influențează aceste viteze. Analizele cinetice permit determinarea **numărului și ordinului** etapelor individuale prin care enzimele transformă substraturile în produși. Studiul cineticii enzimaticе reprezintă și modul principal de identificare a agenților potențial terapeutici care măresc sau inhibă selectiv vitezele proceselor specific enzimaticе. Împreună cu metodele de determinare a structurii, analiza cinetică poate oferi detalii cu privire la mecanismul catalizei enzimaticе. Un set complet și echilibrat de activități enzimaticе este esențial pentru echilibrul homeostatic al organismului. Descifrarea cineticii enzimaticе este deci importantă pentru elucidarea mecanismelor de acțiune a factorilor de stres, cum ar fi anoxia, acidoza sau alcaloza metabolică, intoxicațiile, agenții farmacologici, etc.

O ecuație chimică prezintă speciile care intră în reacție (reactanții sau substraturile) și speciile care rezultă (produșii de reacție), toți în proporția corectă (stoichiometrie). De exemplu, în reacția de mai jos, o moleculă din A reacționează cu o moleculă din B pentru a da o moleculă din P și o moleculă din Q.



Săgeata dubă indică reversibilitatea, o proprietate intrinsecă oricărei reacții. Desemnarea unui anumit participant la reacție drept „reactant” sau „produs” este arbitrară, deoarece ce este reactant într-un sens, devine produs în sensul opus. De regulă, se utilizează termenul de „produși” pentru a desemna speciile a căror formare este favorizată termodinamic. Reacțiile în care factorii termodinamici favorizează clar unii compuși sunt reprezentate unidirecțional, ca și cum are fi „ireversibile”.



Săgețile unidirecționale se folosesc deseori pentru descrierea reacțiilor din organism în care produșii de reacție sunt consumați imediat în altă reacție enzimatică. Îndepărtarea rapidă a produsului P sau Q împiedică reacția reversibilă, făcând ca reacția directă să fie o **reacție funcțional ireversibilă în condiții fiziologice**.

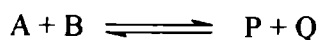
Direcția în care o reacție are loc este determinată de variația energiei libere Gibbs, ΔG (energia liberă sau energia Gibbs). ΔG pentru o reacție chimică este dată de diferența dintre suma energiilor libere ale produșilor de reacție și suma energiilor libere ale reactanților.

$$\Delta G = \sum G_{\text{produși}} - \sum G_{\text{reactanți}}$$

ΔG° denotă schimbările de energie liberă care au loc de la starea inițială (amestec de reactanți și produși, toți de concentrație 1 M) până la starea finală, cea de echilibru. În biochimie se utilizează ΔG° , care definește ΔG° la pH-ul fiziologic 7. Dacă $\sum G_{\text{produși}}$ este mai mică decât $\sum G_{\text{reactanți}}$, ΔG° va fi negativ, iar reacția va decurge spre formare de produși. Semnul și mărimea variației de energie liberă determină sensul și amploarea deplasării unui echilibru chimic. Relația dintre variația energiei libere și constanta de echilibru K_{eq} a unei reacții este dată de relația:

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K_{\text{eq}},$$

Unde R este constanta gazelor, iar T este temperatura absolută. Pentru reacția:



constantă de echilibru este

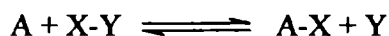
$$K_{\text{eq}} = \frac{[P][Q]}{[A][B]}$$

Când este cunoscută concentrația reactanților la echilibru, se poate calcula valoarea variației energiei libere ΔG° .

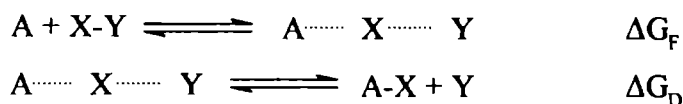
Deoarece ΔG° depinde exclusiv de stările finale și inițiale ale speciilor dintr-o reacție, cunoașterea ei furnizează numai informații despre *direcția și starea de echilibru* a reacției. ΔG° este

independentă de mecanismul reacției și deci nu furnizează nici o informație privind **viteza de reacție**. Din acest motiv, simpla interpretare a ΔG° nu poate explica de ce o reacție poate avea un ΔG° negativ mare, și totuși reacția decurge cu o viteză neglijabilă.

O reacție decurge de cele mai multe ori prin intermediul unei **stări de tranziție**, iar viteza unei reacții este determinată de **energia de activare**. Noțiunea de stare de tranziție este esențială pentru înțelegerea principiilor chimice și termodinamice ale catalizei. Dacă avem de exemplu o reacție de substituție



există un timp în care legătura dintre X și Y este slăbită, dar nu ruptă complet, iar legătura A-X începe să se formeze. Această stare intermediară tranzitorie, în care nu mai există nici reactanți nici produși liberi, este denumită **stare de tranziție** $A \cdots X \cdots Y$. (Liniile punctate reprezintă legăturile parțiale care se rup sau se formează). Reacția de mai sus poate fi considerată ca suma a două reacții parțiale, prima corespunzând reacției de formare (F) a stării de tranziție, a doua din descompunerea (D) a sa. Ambele reacții sunt caracterizate de variații ale energiilor libere, ΔG_F și respectiv ΔG_D .



Pentru reacția totală, $\Delta G = \Delta G_F + \Delta G_D$. Multe reacții au multiple stări de tranziție, iar ΔG reprezintă suma tuturor ΔG_F și ΔG_D . Prin urmare este imposibil de stabilit din ΔG_{total} numărul de stări de tranziție prin care decurge reacția, sau cu alte cuvinte *termodinamica unei reacții nu ne spune nimic despre cinetica ei*.

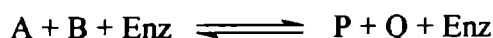
Indiferent de mărimea sau semnul ΔG , ΔG_F pentru marea majoritate a reacțiilor este pozitiv, ceea ce înseamnă că formarea stării de tranziție necesită trecerea unor bariere energetice. Din acest motiv, ΔG_F este denumită și **energia de activare**, E_{act} . Parametrii termodinamici care determină cât de *repede* decurge o reacție sunt deci valorile ΔG_F de formare a stărilor de tranziție prin care decurge reacția. În cazul unei reacții simple,

$$\text{Viteza} \sim e^{\frac{-E_{act}}{RT}}$$

Energia de activare a unei reacții care decurge în direcție opusă este – ΔG_D . Viteza unei reacții depinde de frecvența și energia cu care moleculele reactanților vin în contact. Acestea depind la rândul lor de temperatură și de concentrația reactanților.

Enzimele scad energia de activare. Toate enzimele accelerează reacțiile pe care le catalizează datorită faptului că duc la formarea unor stări de tranziție cu ΔG_F mic comparativ cu ΔG_F al reacției necatalizate, deoarece conformația situsului activ scade ΔG_F prin stabilizarea stării de tranziție.

Enzimele nu afectează echilibrul chimic. Deși pot suferi modificări tranzitorii în timpul catalizei, enzimele se regăsesc neschimbate la sfârșitul reacției. Prezența unei enzime deci nu are nici o influență asupra ΔG° al reacției, care depinde exclusiv de starea finală și inițială a reactanților. Într-o reacție enzimatică de tipul:



expresia constantei de echilibru

$$K_{eq} = \frac{[P][Q][\text{Enz}]}{[A][B][\text{Enz}]} = \frac{[P][Q]}{[A][B]}$$

denotă faptul că prezența enzimelor nu afectează K_{eq} .

5.7.1. Factorii care influențează viteza reacțiilor catalizate de enzime

Temperatura. Creșterea temperaturii determină creșterea vitezei unei reacții, atât catalizate cât și necatalizate, datorită creșterii energiei cinetice și frecvenței de ciocnire a speciilor participante la reacție. În cazul enzimelor, energia termică poate duce la creșterea energiei cinetice până la punctul în care sunt distruse legăturile necovalente care mențin conformația tridimensională a enzimei. Atunci lanțul polipeptidic începe să se deplieze sau să se **denatureze**, lucru care duce la pierderea rapidă a activității. Intervalul de temperatură în care o enzimă își menține o conformație stabilă catalitic competentă depinde de celula și organismul de proveniență al enzimei, de regulă fiind ușor mai mare decât temperatura fiziologică. Enzimele umane, de exemplu, sunt în general stabile până la temperaturi de 45-55°C. Enzimele izolate din microorganisme termofile, are trăiesc în izvoarele termale sau în gropile submarine hidrotermale pot fi stabile pâna la sau chiar peste 100°C.

Factorul cu care viteza unei reacții crește la ridicarea temperaturii cu 10°C se numește **coeficient de temperatură (Q_{10})**.

$$Q_{10} = \frac{k_{t+10}}{k_t}$$

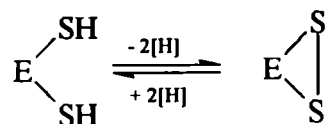
unde k_t este viteza la temperatura t , iar k_{t+10} este viteza la temperatura $t+10$. Valoarea Q_{10} pentru reacțiile enzimatică este cuprinsă între 1 și 2, fiind mai mică decât pentru reacțiile necatalizate (3-4). Relația este valabilă pâna la o temperatură numită **temperatura optimă**, pentru care viteza de reacție atinge valoarea maximă. La organismele cu „sânge rece” (batracieni, reptile), modificări ale vitezelor de reacție cu temperatura constituie modul lor de supraviețuire atunci când temperatura mediului ambiant variază drastic. În cazul mamiferelor sau a altor organisme homeoterme schimbări ale vitezelor de reacție cu temperatura capătă semnificație biologică doar în cazurile de febră sau hipotermie.

Influența pH-ului. Influența pH-ului asupra activității enzimelor este mult mai complexă și mai variată. Enzimele sunt active într-un domeniu limitat de pH, în majoritatea cazurilor efectul catalitic fiind maxim la o anumită valoare de pH, numit **pH optim de acțiune**. Vitezele majorității reacțiilor catalizate de enzime sunt influențate de concentrația ionilor de hidrogen din mediul de reacție. Majoritatea enzimelor au o activitate optimă la pH-uri cuprinse între 5 și 9 și reprezintă chiar pH-ul normal al mediului în care își îndeplinesc funcția catalitică. Există și enzime care prezintă activitate optimă în afara acestui interval (de exemplu, pepsina are pH optim 1,5). Există situații când două enzime cu aceeași specificitate, dar cu proveniență diferită au pH-uri optime diferite; este cazul fosfatazei alcaline hepatice cu pH optim apropiat de 9 și al fosfatazei acide din prostată cu pH optim 5.

Relația activitate-pH reflectă echilibrul dintre denaturarea enzimelor la pH mare sau mic, precum și efectele asupra încărcăturii electrice a enzimei și a substratului. Ionii H^+ și OH^- au efecte multiple asupra enzimelor, inclusiv efect denaturant. Enzimele ale căror situsuri active conțin grupări ionizabile acide sau bazice interacționează direct cu ionii H^+ și OH^- rezultatul fiind creșterea sau scăderea gradului lor de disociere.

În fiecare celulă există un amestec complex de enzime, deci se poate considera că pH-ul intra- și extracelular poate constitui un factor important de reglare a proceselor metabolice. Acidul lactic – factorul de oboseală rezultat în urma unei activități musculare intense – duce la acea stare de epuizare prin acidifierea citoplasmei și blocarea sintezei de ATP, deoarece sunt inhibitate enzimele din întreg fluxul glicolitic.

Potențialul redox al mediului influențează starea grupărilor din constituția enzimelor care pot suferi oxidări sau reduceri. Această influență se exercită în special asupra grupărilor SH.



Aceste modificări pot determina schimbări conformaționale ale enzimei care vor afecta activitatea enzimatică.

Radiațiile ionizante (raze X, unde radioactive α , β sau γ) în doze mici formează specii oxidante care pot inactiva enzimele, în special acelea care conțin grupe –SH în situsul activ. Efectul acestor radiații poate fi și direct, prin producere de ionizări la nivelul moleculei de enzimă.

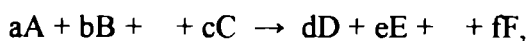
Vibrațiile sonore și ultrasunetele provoacă reacții multiple în moleculele enzimelor cum ar fi: oxidarea nucleelor aromatice, liza grupărilor –SH, depolimerizarea.

Ațiunea presiunilor înalte. Presiuni de peste 10 000 atmosfere determină modificări ale gradului de ionizare al proteinei, ale derulării lanțului peptidic, ale structurii și gradului de ionizare al mediului ce înconjoară enzima.

5.7.2. Viteza reacțiilor enzimaticе

Majoritatea determinărilor de viteze ale reacțiilor enzimaticе se fac pe perioade scurte de timp, condiții în care viteza de reacție este aproximativ egală cu **viteza inițială de reacție (V_i)**. În aceste condiții se acumulează numai o cantitate mică de produs de reacție, așa încât reacția inversă poate fi neglijată. Prin urmare, *viteza inițială a reacției este cea a reacției directe*. În determinările de activitate enzimatică se utilizează un exces molar mare (10^3 - 10^7) de substrat comparativ cu enzima, astfel încât determinarea vitezei inițiale de reacție permite estimarea cantității de enzimă din proba biologică.

Ordinul de reacție. Într-o reacție de tip general:



unde A, B, C reprezintă reactanții, D, E, F produșii de reacție, iar a, b, c, d, e, f coeficienții stoichiometrici, viteza de reacție va fi dată de formula:

$$v = k[A]^a [B]^b [C]^c,$$

în care k este constanta vitezei de reacție. Suma exponenților concentrațiilor din formula vitezei, notată cu n , reprezintă ordinul acestei reacții. Sub raport cinetic, reacțiile chimice, inclusiv cele enzimatice, se diferențiază prin ordinul de reacție în reacții de ordinul 0, 1, 2, etc.

Influența concentrației de substrat asupra vitezei de reacție. În cele ce urmează, vom trata reacțiile catalizate de o enzimă E ca și când ar avea un singur substrat S și un singur produs P . Deși majoritatea enzimelor au mai mult de un substrat, principiile de mai jos se aplică și în cazul enzimelor cu mai multe substraturi.



În condițiile în care concentrația enzimei este menținută constantă, iar concentrația substratului crește, viteza de reacție variază după o curbă care corespunde unei hiperbole echilatre care tinde asimptotic la valoarea maximă a vitezei $V_{\max}$.

În cazul unei enzime tipice, pe măsură ce crește concentrația substratului, viteza inițială V_i crește până ce atinge o valoare maximă, $V_{\max}$. Când creșteri ale concentrației substratului $[S]$ nu mai provoacă creșteri ale vitezei de reacție, se spune că enzima este **saturată cu substrat**. În orice moment al reacției, se consideră că numai moleculele de substrat care sunt combinate cu enzima în complexul enzimă-substrat ES se pot transforma în produsul P . Constanta de echilibru a reacției de formare a complexului ES nu este foarte mare; din această cauză, deși substratul se află în exces (punctele A și B din figura de mai jos) numai o fracțiune din enzimă va fi prezentă în complexul ES . În punctele A și B, creșterea sau scăderea $[S]$ va determina o creștere sau scădere a concentrației $[ES]$, și implicit a vitezei V_i . În punctul C (Figura 5.9) practic întreaga cantitate de enzimă se găsește legată în complexul ES . Din cauză că nu mai există enzimă liberă, creșterea $[S]$ nu mai influențează viteza de reacție. În aceste condiții, viteza de reacție depinde exclusiv de viteza cu care enzima este eliberată din complexul ES .

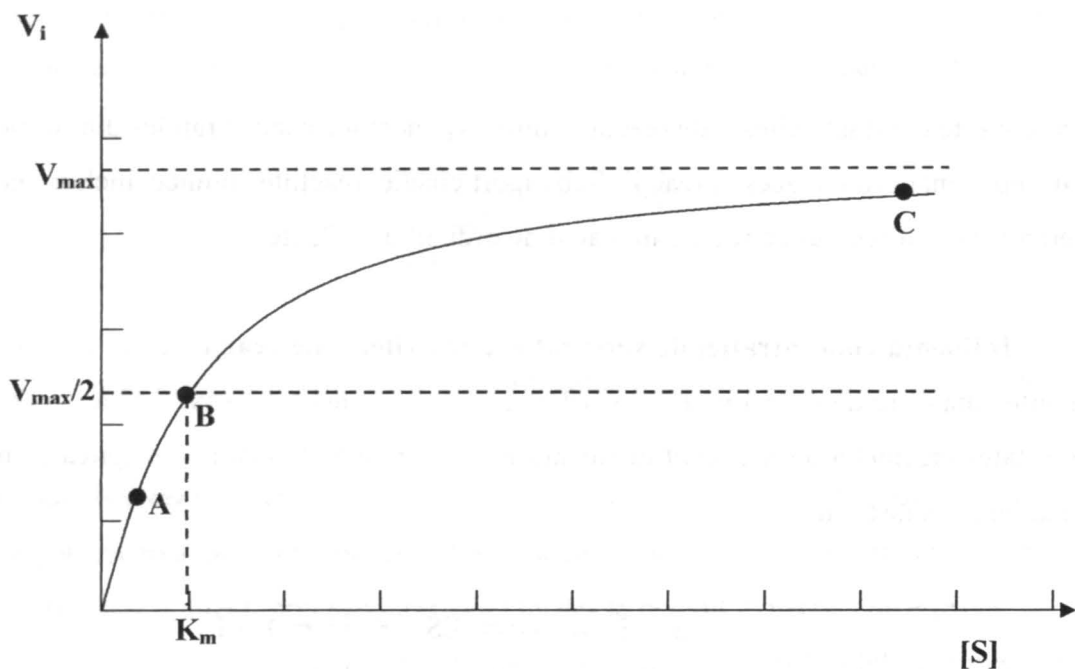


Figura 5.9. Efectul concentrației de substrat $[S]$ asupra vitezei inițiale V_i a unei reacții catalizate de o enzimă

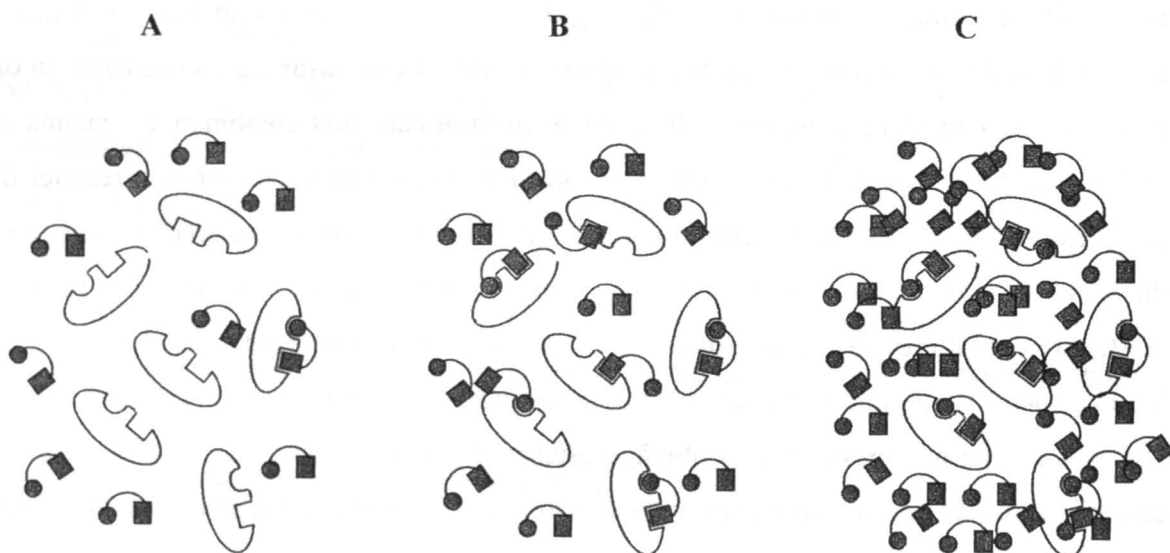
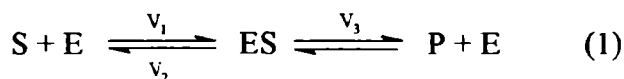


Figura 5.10. Reprezentarea unei enzime la concentrație mică (A), intermediară (B) și mare (C) de substrat.

Ecuția Michaelis-Menten & Hill

Dintre factorii care determină viteza unei reacții enzimaticе, concentrația substratului are o importanță deosebită. Efectul de saturare cu substrat a făcut ca Michaelis și Menten să conceapă o teorie generală a acțiunii enzimelor privitoare la aspectele cantitative ale dependenței vitezei de reacție de concentrația substratului. Această teorie se bazează pe ipoteza confirmată experimental că în cazul unei reacții enzimaticе între enzimă și substratul ei se formează complexe intermediare activate enzimă-substrat (ES) care apoi se scindează, punând în libertate produșii de reacție și enzima liberă, aceasta fiind capabilă să se combine cu o altă moleculă de substrat.



Deoarece se consideră faza inițială a reacției, reacția inversă de combinare a enzimei cu produsul P este nulă. Se consideră $[E]_T$ = concentrația totală a enzimei; $[ES]$ = concentrația complexului enzimă-substrat; $[E] = [E]_T - [ES]$ = concentrația enzimei libere necombinate; $[S]$ = concentrația substratului, care este mult mai mare decât concentrația totală a enzimei. Ecuția (1) include două reacții:



Sub aspect cinetic, fiecare reacție se caracterizează printr-o viteză de reacție, respectiv printr-o constantă de viteză specifică (k_1 , k_2 , k_3). Astfel, din ecuațiile (2) și (3) rezultă:

$$V_1 = k_1[E][S] = k_1([E]_T - [ES]); \quad V_2 = k_2[ES]; \quad V_3 = k_3[ES] \quad (4)$$

La echilibru, viteza de formare a complexului ES este egală cu viteza de descompunere a acestui complex în produs și enzima liberă.

$$k_1([E]_T - [ES])[S] = (k_2 + k_3)[ES] \quad (5) \qquad \text{sau}$$

$$\frac{k_2 + k_3}{k_1} = \frac{([E]_T - [ES])[S]}{[ES]} \quad (6)$$

Vom nota $(k_2 + k_3)/k_1 = K_m$ sau constanta lui Michaelis, care reprezintă constanta de disociere a complexului enzimă-substrat.

$$K_m[ES] = ([E]_T - [ES]) [S] \quad (7) \quad \text{sau}$$

$$[ES] = \frac{[E]_T [S]}{K_m + [S]} \quad (8)$$

Deoarece viteza inițială a unei reacții (V_i) este dată de viteza de descompunere a complexului ES în produsul P, putem scrie:

$$V_i = k_3[ES] \quad (9) \quad \text{de unde} \quad [ES] = k_3/V_i \quad (10)$$

Înlocuind (10) în (8) obținem:

$$V_i = \frac{k_3[E]_T [S]}{K_m + [S]} \quad (11)$$

Viteza maximă de reacție ($V_{\max}$) va fi atinsă când întreaga cantitate de enzimă este combinată cu substratul. Atunci putem considera:

$$V_{\max} = k_3[E]_T \quad (12) \quad \text{sau} \quad k_3 = V_{\max}/[E]_T \quad (13)$$

Înlocuind (13) în (11) se obține ecuația Michaelis-Menten:

$$V_i = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]} \quad (14)$$

Ecuația Michaelis-Menten este expresia matematică ce definește relația cantitativă dintre viteza de reacție enzimatică, concentrația substratului și constanta K_m .

Când $V_i = V_{\max}/2$, $K_m = [S]$. Prin urmare **constantă Michaelis K_m reprezintă concentrația substratului la care V_i este jumătate din viteza maximă $V_{\max}$ a reacției la o anumită concentrație a enzimei.** Modul în care V_i depinde de $[S]$ și de K_m poate fi ilustrat prin interpretarea ecuației Michaelis-Menten în trei situații.

- 1) Când $[S]$ este mult mai mic decât K_m (punctul A în Figura 5.9), termenul $K_m + [S]$ este aproximativ egal cu K_m . Înlocuind $K_m + [S]$ cu K_m în ecuația (14) rezultă:

$$V_i \approx \frac{V_{\max}[S]}{K_m} \approx \left[\frac{V_{\max}}{K_m} \right] [S] \quad (15)$$

Unde „ $\approx$ ” înseamnă „aproximativ egal cu”. Deoarece atât $V_{\max}$ cât și K_m sunt constante, și raportul lor este constant. Cu alte cuvinte, când $[S]$ este considerabil mai mică decât K_m , viteza inițială de reacție este proporțională cu concentrația substratului (reacție de ordinul I).

- 2) Când $[S]$ este mult mai mare decât K_m (punctul C în Figura 5.9) termenul $K_m + [S]$ este aproximativ egal cu $[S]$. Prin înlocuirea în ecuația (14) a termenului $K_m + [S]$ cu $[S]$ rezultă:

$$V_i \approx \frac{V_{\max}[S]}{[S]} \approx V_{\max} \quad (16)$$

Astfel, când $[S]$ depășește cu mult valoarea K_m , viteza de reacție este maximă și nu mai este afectată de creșterea concentrației de substrat (reacție de ordinul 0).

- 3) Când $[S] = K_m$ (punctul B în Figura 5.9), viteza de reacție este jumătate din viteza maximă.

$$V_i \approx \frac{V_{\max}[S]}{2[S]} \approx \frac{V_{\max}}{2} \quad (17)$$

Ecuația (17) arată că K_m reprezintă – și poate fi determinată experimental de aici – concentrația de substrat la care viteza de reacție este jumătate din viteza maximă.

Ecuația Lineweaver-Burk

Pentru a determina experimental valorile $V_{\max}$ și K_m necesită folosirea unor concentrații mari de substrat pentru a atinge condiția de saturare a enzimei, lucru de cele mai multe ori greu de realizat în practică. Această dificultate este depășită prin utilizarea unei variante liniare a ecuației Michaelis-Menten, care permite determinarea $V_{\max}$ și K_m prin extrapolarea datelor obținute la concentrații ale substratului mult mai mici decât concentrația de saturare. Inversând ecuația (14) se obține reciproca:

$$\frac{1}{V_i} = \frac{K_m + [S]}{V_{\max} [S]} \quad (18)$$

sau

$$\frac{1}{V_i} = \left(\frac{K_m}{V_{\max}} \right) \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}} \quad (19)$$

Ecuția (19) este cunoscută sub numele de ecuația Lineweaver-Burk. Este o ecuație de gradul I de tipul $y = ax + b$, unde $y = 1/V_i$ iar $x = 1/[S]$. Reprezentarea grafică a $1/V_i$ funcție de $1/[S]$ este o dreaptă care intersectează axa y în punctul $1/V_{\max}$, axa x în punctul $-1/K_m$ și are panta $K_m/V_{\max}$.

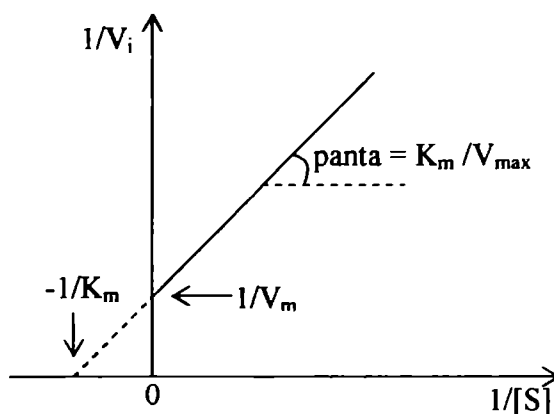
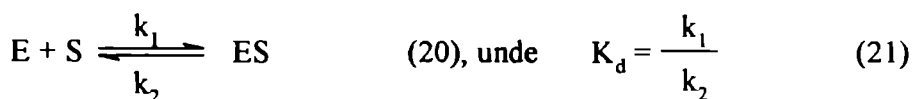


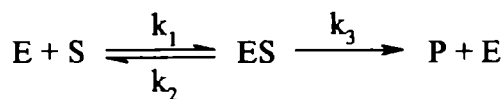
Figura 5.11. Reprezentarea Lineweaver-Burk $1/V_i$ funcție de $1/V_{\max}$ este utilizată pentru determinarea experimentală a K_m și $V_{\max}$.

Constanta K_m poate fi aproximată cu o constantă de legare

Afinitatea unei enzime pentru substratul său este inversul constantei de disociere K_d a complexului enzimă-substrat ES.



Cu alte cuvinte, cu cât este mai mică tendința complexului ES de a se disocia, cu atât este mai mare afinitatea enzimei pentru substratul său. Pentru o reacție enzimatică de tipul :



valoarea lui $[S]$ la $V_i = V_{\max}/2$ este:

$$[S] = \frac{k_2 + k_3}{k_1} = K_m \quad (22)$$

Când $k_2 \gg k_3$, atunci $k_2 + k_3 \approx k_2$, iar

$$[S] \approx \frac{k_2}{k_1} = K_d \approx K_m \quad (23)$$

În aceste condiții, se poate spune că o enzimă cu un K_m mic are o afinitate mare pentru substratul său, și invers. Constanta K_m este în multe cazuri aproximativ egală cu constanta de disociere K_d , dar aceasta numai când asocierea și disocierea complexului ES sunt procese rapide față de etapa determinantă de viteză. Pentru multe reacții enzimatice însă, $k_2 + k_3$ nu este aproximativ egal cu k_2 , iar K_m va fi mai mare decât K_d .

Ecuția Hill descrie comportarea enzimelor care prezintă un mod de legare cooperativă a substratului

În timp ce majoritatea enzimelor prezintă o curbă de saturație cu substrat simplă (Figura 5.9) descrisă prin ecuația Michaelis-Menten, unele enzime își leagă substratul într-un mod cooperativ. Modul cooperativ de legare a substratului poate fi întâlnit la enzimele multimerice, care leagă substratul la mai multe situsuri. În cazul enzimelor care prezintă cooperare pozitivă în procesul de legare a substratului, forma curbei care exprimă modificările V_i în funcție de $[S]$ este sigmoidală (Figura 5.12). În acest caz, nici ecuația Michaelis-Menten, nici reciproca sa Lineweaver-Burk nu descriu cinetica saturației cu substrat.

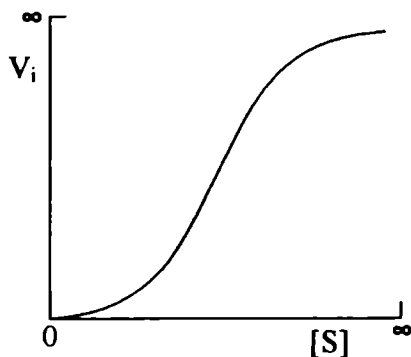


Figura 5.12. Curba de saturație cu substrat a unei enzime care acționează după o cinetică sigmoidă.

Enzimologii utilizează în acest caz o reprezentare grafică a **ecuației Hill** dezvoltată inițial pentru a descrie legarea cooperativă a O_2 de către hemoglobină. Ecuația (24) reprezintă forma liniară a ecuației Hill, unde k' este constanta complexului.

$$\frac{\log V_i}{V_{\max} - V_i} = n \log [S] - \log k' \quad (24)$$

Din ecuația (24) rezultă că atunci când $[S]$ este relativ mică față de k' , viteza inițială a reacției enzimatică crește cu a n -a putere a $[S]$. Reprezentarea grafică a $\log V_i/(V_{\max}-V_i)$ funcție de $\log [S]$ ne dă o dreaptă (Figura 29) a cărei pantă este **coeficientul Hill**, un parametru empiric a cărui valoare depinde de numărul, felul și tăria interacțiilor dintre situsurile enzimatic multiple de legare a substratului. Când $n = 1$, situsurile de legare acționează independent, iar enzima acționează după o cinetică Michaelis-Menten. Când $n > 1$, se spune că enzimă prezintă cooperare pozitivă în legarea substratului.

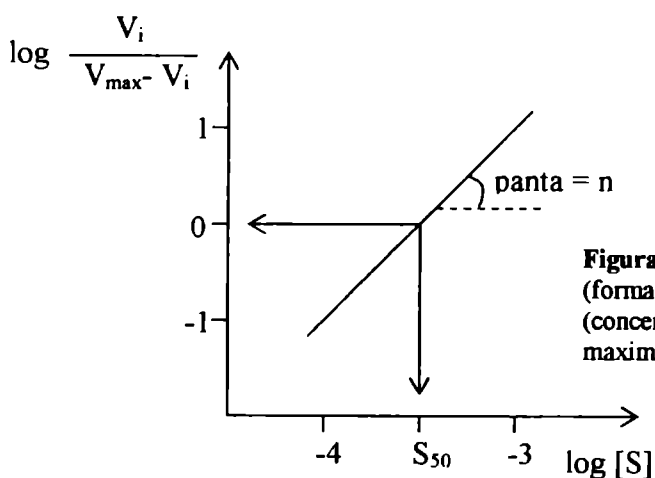


Figura 5.13. Reprezentarea grafică a ecuației Hill (forma liniară) utilizată pentru evaluarea S_{50} (concentrația de substrat la care se atinge viteza semi-maximă, $V_{\max}/2$) și a gradului de cooperativitate, n .

În general, legarea primei molecule de substrat mărește afinitatea enzimei pentru următoarele molecule de substrat. Cu cât este mai mare valoarea lui n , cu atât este mai mare gradul de cooperare. Perpendiculara dusă din punctul y unde $\log V_i/(V_{\max}-V_i)$ este zero intersectează axa x în punctul corespunzător $\log S_{50}$. S_{50} reprezintă concentrația de substrat la care V_i este jumătate din viteza maximă.

5.8. Efectori enzimatici

Activitatea enzimelor poate fi influențată într-un sens sau într-altul de către diferite substanțe numite **efectori**. Efectorii enzimatici sunt substanțe de natură foarte diferită care acționează asupra enzimelor modificând cinetica reacțiilor enzimatice. După modul în care acționează, efectorii enzimatici se clasifică în: **activatori**, **inhibitori** și **alosterici**.

5.8.1. Activatorii enzimatici

Activatorii enzimatici influențează în sens pozitiv activitatea enzimelor pe care o favorizează sau o stimulează. În funcție de natura lor, activatorii enzimatici își pot exercita acțiunea în mod diferit.

- 1) **Activatori ai unor proenzime.** Forma inactivă a enzimelor poartă denumirea de **zimogen**, **proenzimă** sau **precursor**. În starea inactivă, centrii activi ai enzimei sunt mascați. Trecerea în starea activă constă în eliminarea unei părți din moleculă, și astfel centrii activi ai enzimei sunt scoși la iveală. Exemple:



- 2) **Activare prin antiinhibiție.** Există activatori care acționează asupra vitaminelor prin protejarea acestora față de anumiți inhibitori. Acești activatori se numesc **protectori**. Exemple: vitaminele E, K, C (protejează enzimele de acțiunea unor agenți oxidanți, cum ar fi peroxizii).
- 3) **Activatorii propriu-ziși.** Activarea are loc în acest caz prin efectul unor ioni sau metaboliți care favorizează activitatea catalitică a enzimelor sau fixarea moleculei de substrat. Exemple: ionii Mg^{2+} sunt activatori ai fosfatazelor, Mn^{2+} și Co^{2+} ai peptidazelor, Zn^{2+} ai alcooldehidrogenazi, Cl^- ai amilazei, etc.
- 4) **Substanțe cu caracter reducător.** În acest caz activarea are loc prin protejarea grupărilor tiol (-SH) active din situsul catalitic al unor enzime. Exemple: cisteina, glutatiunul redus (G-SH).

5.8.2. Inhibitorii enzimatici

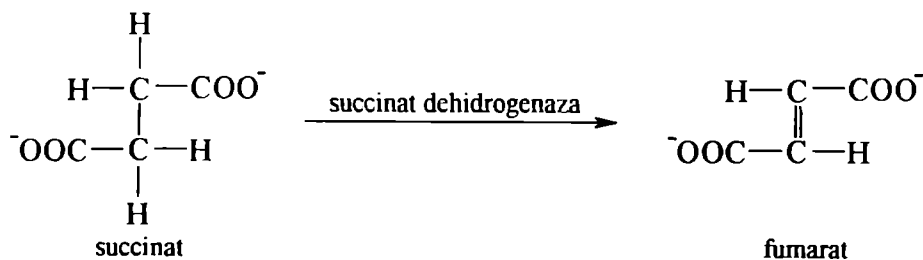
Inhibitorii enzimatici constituie atât agenți farmacologici cât și unelte pentru cercetarea mecanismelor de acțiune a enzimelor. Ei influențează negativ activitatea enzimatică, pe care o pot anula definitiv (ireversibil) sau numai temporar (reversibil). Inhibitorii pot fi clasificați în funcție de:

- locul de acțiune asupra enzimelor (pot afecta fie situsul catalitic, fie altă regiune a moleculei de enzimă, cu urmări asupra modului de legare a substratului);
- modul de legare cu enzima (dacă o modifică din punct de vedere chimic sau nu);
- parametrii cinetici pe care îi influențează.

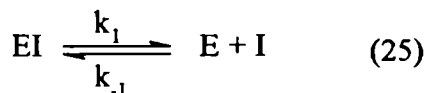
Din punct de vedere cinetic se disting două clase de inhibitori: competitivi și necompetitivi. Această clasificare este bazată pe capacitatea substratului de a anula sau nu inhibiția atunci când concentrația sa crește.

Inhibiția competitivă

Efectele inhibitorilor competitivi pot fi anulate prin ridicarea concentrației de substrat. Cel mai frecvent, în inhibiția competitivă, inhibitorul **I** se leagă direct de porțiunea din situsul activ responsabilă de legarea substratului, blocând prin aceasta accesul substratului. Majoritatea inhibitorilor competitivi au o structură asemănătoare substratului (**analogi ai substratului**). Un exemplu care ilustrează inhibiția competitivă cu un analog de substrat este inhibiția enzimei succinat dehidrogenaza de către malonat. Succinat dehidrogenaza catalizează îndepărtarea a câte unui atom de hidrogen de la fiecare din grupările CH_2 ale succinatului.



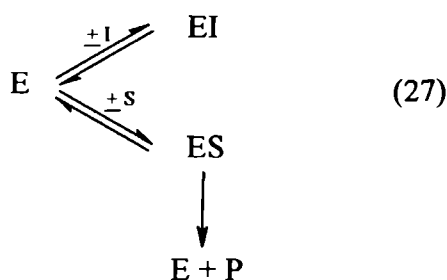
Atât succinatul cât și analogul său, malonatul ($^-\text{OOC}-\text{CH}_2-\text{COO}^-$) se pot lega la situsul activ al succinat dehidrogenazei, formând un complex ES și respectiv EI. Din cauză că malonatul conține o singură grupare metilen, el nu poate fi dehidrogenat. Formarea și disocierea complexului EI este un proces dinamic descris de:



pentru care constanta de echilibru K_i este:

$$K_i = \frac{[E][I]}{[EI]} = \frac{k_1}{k_{-1}} \quad (26)$$

De fapt, *un inhibitor competitiv acționează prin scăderea numărului de molecule de enzimă liberă care se poate lega de substrat pentru a forma complexul ES și eventual produsul de reacție P*. Acest lucru poate fi reprezentat:



Substratul și inhibitorul competitiv exercită ambii efecte asupra concentrațiilor complexelor ES și EI. Deoarece prin legarea substratului se micșorează numărul moleculelor de enzimă liberă care ar putea lega inhibitorul, mărirea $[S]$ duce la descreșterea $[EI]$ și prin urmare are loc o creștere a vitezei de reacție. Gradul în care $[S]$ trebuie mărit pentru a anula complet acțiunea inhibitorului depinde de concentrația inhibitorului, de afinitatea sa pentru enzima E (K_i) și de K_m -ul enzimei.

Reprezentările Lineweaver-Burk se pot utiliza pentru a face distincție între inhibiția competitivă și cea necompetitivă și pentru a evalua constantele de inhibiție K_i . Pentru aceasta, se determină vitezele de reacție la câteva concentrații diferite de substrat, atât în prezența cât și în absența inhibitorilor. În cazul inhibiției competitive, cele două linii obținute prin unirea punctelor experimentale se întâlnesc pe axa y (Figura 5.14).

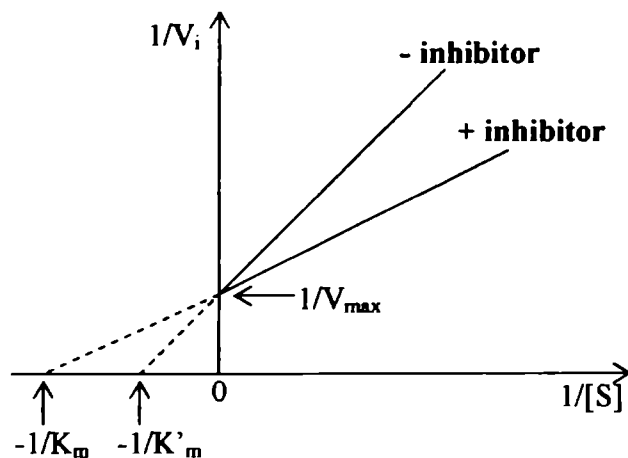


Figura 5.14. Reprezentarea Lineweaver-Burk în cazul inhibiției necompetitive simple.

Deoarece intersecția cu axa y se face la valoarea $1/V_{\max}$, înseamnă că atunci când $1/[S]$ tinde spre zero, V_i este independentă de prezența inhibitorilor. Intersecția cu axa x depinde de concentrația inhibitorului și deoarece $1/K'_m < 1/K_m$, K'_m („ K_m aparent”) devine mai mare în prezența inhibitorilor competitivi. Prin urmare, **un inhibitor competitiv nu influențează $V_{\max}$, dar mărește K'_m , K_m -ul aparent pentru substrat.**

Inhibiția necompetitivă

În cazul inhibiției necompetitive, legarea inhibitorului de enzimă nu influențează legarea substratului, fiind posibilă formarea complexelor EI și EIS.

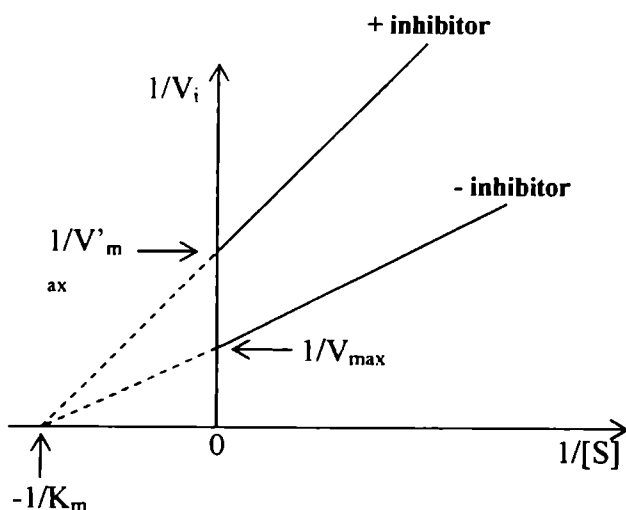


Figura 5.15. Reprezentarea Lineweaver-Burk în cazul inhibiției competitive simple.

Complexul enzimă-inhibitor are capacitatea de a lega substratul, însă eficiența sa de a transforma substratul în produs – exprimată prin $V_{\max}$ - este redusă. Inhibitorii necompetitivi se leagă prin situsuri diferite de situsul de legare a substratului, și de regulă nu prezintă asemănări structurale cu substratul.

În inhibiția necompetitivă simplă, E și EI prezintă aceeași afinitate pentru substrat, iar complexul EIS generează produsul P cu o viteză neglijabilă. Intersecția cu axa x este

$$\frac{-1}{K_m} \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right) \quad (28)$$

Odată ce K_m a fost determinat în absența inhibitorilor, K_i poate fi calculat din relația (28). Valorile K_i se utilizează pentru a compara mai mulți inhibitori ai aceleiași enzime. Cu cât K_i este mai mic, cu atât inhibitorul este mai eficient.

Există și alte tipuri de inhibiție necompetitivă mai complexe, când legarea inhibitorului afectează modul de legare a substratului, dar acestea nu vor fi prezentate aici.

Inhibiția ireversibilă

În exemplele de mai sus, inhibitorii formează un complex dinamic, dissociabil cu enzima, astfel încât după îndepărtarea inhibitorului enzima poate fi recuperată fără modificări în activitatea ei. O serie de alți inhibitori însă acționează ireversibil prin producerea de modificări chimice asupra enzimei. Aceste modificări presupun ruperi și formări de legături covalente cu resturile aminoacil din structura enzimei care sunt esențiale pentru legarea substraturilor, cataliză sau menținerea conformației funcționale. Deoarece aceste legături sunt relativ stabile, se spune că enzima a fost „otrávită” și în acest caz ea rămâne inhibată chiar și după îndepărtarea inhibitorului.

5.9. Reacții enzimatică cu două sau mai multe substraturi

În timp ce multe enzime au un singur substrat, există și enzime care au două – și uneori chiar mai multe – substraturi și produși de reacție. Principiile fundamentale discutate mai sus ilustrate pentru enzime cu un singur substrat se aplică și în cazul enzimelor cu substraturi multiple. Expresiile matematice utilizate pentru a evalua reacțiile cu substraturi multiple sunt însă complexe. În cele ce urmează, vom face câteva considerații numai asupra reacțiilor „două substraturi-doi produși” (reacții „Bi-Bi”).

5.9.1. Reacții secvențiale sau reacții de substituție simplă

În **reacțiile secvențiale** ambele substraturi trebuie să se combine cu enzima pentru ca procesul catalitic să aibă loc, formându-se un complex ternar. Reacțiile secvențiale mai sunt denumite și reacții de substituție simplă deoarece gruparea care suferă transferul este trecută direct, într-o singură etapă, de la un substrat la celălalt. Reacțiile secvențiale „Bi-Bi” se deosebesc prin modul în care cele două substraturi sunt preluate de enzimă: **într-o ordine obligatorie sau la întâmplare**. În cazul reacțiilor în care ordinea e întâmplătoare, substratul A sau substratul B se pot combina cu enzima E pentru a forma complexe EA sau EB (Figura 5.16, centru). Pentru reacțiile cu ordine obligatorie, A se combină întâi cu E înainte ca B să se poată combina cu complexul EA (Figura 5.16, sus). O explicație pentru „ordinea obligatorie” ar fi faptul că legarea lui A la enzimă induce modificări conformaționale în enzimă care sunt necesare pentru recunoașterea și legarea lui B.

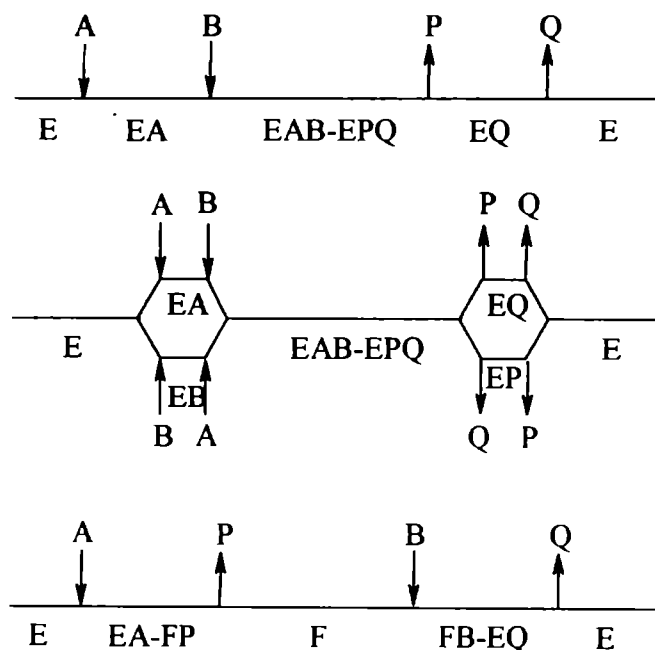


Figura 5.16. Reprezentări ale trei clase de reacții „Bi-Bi”. Liniile orizontale reprezintă enzima, iar săgețile reprezintă venirea substraturilor și plecarea produșilor. **Sus:** O reacție „Bi-Bi” ordonată, caracteristică multor oxido-reductaze NAD(P)H-dependente. **Centru:** O reacție „Bi-Bi” întâmplătoare, caracteristică multor kinaze și dehidrogenaze. **Jos:** O reacție ping-pong, caracteristică aminotransferazelor și serin proteazelor.

5.9.2. Reacții ping-pong

Termenul „ping-pong” se aplică reacțiilor în care unul sau mai mulți produși de reacție sunt eliberați din complexul cu enzima înainte de a fi legate toate substraturile. Reacțiile ping-pong presupun o formă modificată tranzitoriu a enzimei. Ele sunt **reacții de substituție dublă**. Gruparea care este transferată este întâi dislocuită din substratul A de către enzima E, formându-se un produs P și o formă modificată a enzimei, F. A doua substituție constă în transferul grupării de la forma F la al doilea substrat B, formându-se produsul Q și regenerându-se forma E a enzimei (Figura 5.16, jos).

Majoritatea reacțiilor „Bi-Bi” se supun unei forme ceva mai complexe de cinetică Michaelis-Menten, în care $V_{\max}$ se referă la viteza atinsă când ambele substraturi sunt prezente în mediul de reacție la nivel de saturație. Fiecare substrat are K_m -ul său caracteristic care corespunde concentrației care asigură o viteză egală cu jumătate din $V_{\max}$ în condițiile în care celălalt substrat se află la concentrația de saturație. Ca și în cazul reacțiilor cu un singur substrat, se utilizează reprezentări gen Lineweaver-Burk pentru determinarea K_m și $V_{\max}$. V_i se determină ca o funcție de concentrația unui singur substrat (substratul variabil) în timp ce concentrația celui alt substrat (substratul fix) este menținută constantă. Dacă liniile obținute pentru câteva concentrații fixe de substrat sunt reprezentate pe același grafic, se poate face o distincție între o enzimă ping-pong (care va da linii paralele) și o enzimă care funcționează prin mecanism secvențial (care va da o rețea de linii care se intersectează) (Figura 32).

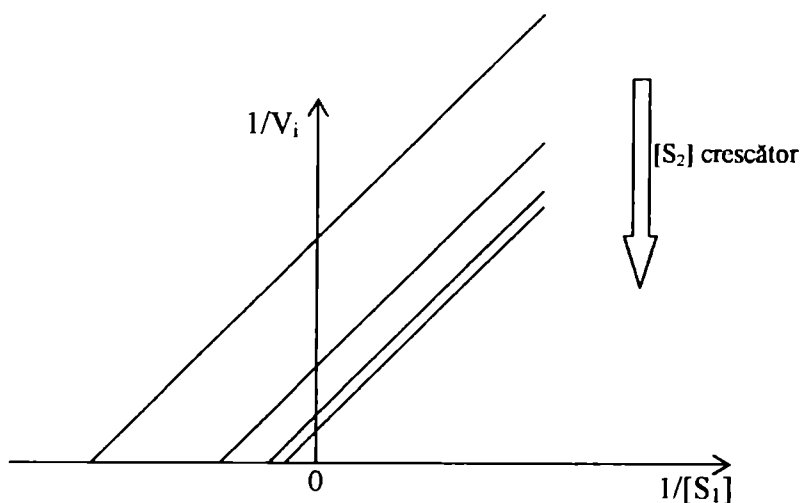


Figura 5.17. Diagrama Lineweaver-Burk pentru o reacție ping-pong cu două substraturi. Creșterea concentrației unuia dintre substraturi (S_1) în timp ce concentrația celui de-al doilea substrat (S_2) este menținută constantă modifică valorile intersecțiilor cu axele x și y, dar nu și panta graficelor.

Studiile cu inhibitori se utilizează pentru a completa studiile cinetice și pentru a face distincția dintre reacții „Bi-Bi” ordonate și întâmplătoare. De exemplu, pentru un mecanism secvențial (Figura 31, jos) numai produsul Q va da o diagramă care să indice o inhibiție competitivă când A este substratul variabil, în timp ce produsul P va da o astfel de diagramă numai cu B pe post de substrat variabil. Celelalte combinații de inhibitori și substraturi variabile vor da diagrame corespunzătoare unei inhibiții complexe necompetitive.

5.10. Reglarea activității enzimaticе

În secolul al XIX-lea fiziologul Claude Bernard a introdus bazele conceptuale ale **reglării metabolice**. El a observat că organismele vii răspund la schimbările multiple care au loc atât în afara cât și în interiorul organismului prin mecanisme care sunt dozate atât cantitativ cât și temporal pentru a permite organismului să supraviețuiască. Walre Cannon a introdus ulterior noțiunea de **homeostazie** pentru a descrie capacitatea animalelor de a menține un mediu intracelular constant în ciuda schimbărilor care au loc în mediul extracelular. Acum știm că organismul răspunde la schimbările din mediul intern și extern prin modificări coordonate și echilibrate ale vitezelor reacțiilor metabolice specifice. O serie de boli umane, cum ar fi cancerul, diabetul, fibroza cistică sau maladia Alzheimer, sunt caracterizate prin disfuncții reglatoare cauzate de agenți patogeni sau de modificări genetice. De exemplu, o serie de virusuri oncogene sintetizează protein-tirozin kinaze care modifică procesele de reglare care controlează expresia genelor, contribuind la inițierea și progresia cancerului. Toxina din *Vibrio cholerae*, agentul care cauzează holera, perturbă căile de răspuns senzorial în celulele epiteliale intestinale prin intermediul ADP-ribozilării proteinelor G (GTP-binding proteins) care fac legătura între receptorii de la suprafața celulelor și adenil ciclază. Activarea ulterioară a ciclazei provoacă invadarea cu apă a intestinului, rezultând diaree puternică și deshidratare. *Zersinia pestis*, agentul patogen al ciumei, sintetizează o protein-tirozin fosfatază care hidrolizează grupările fosfat ale unor proteine citoscheletice cheie. Cunoașterea factorilor care controlează vitezele reacțiilor catalizate de enzime este deci esențială pentru înțelegerea bazelor moleculare ale bolilor.

Enzimele care operează la capacitatea lor maximă nu dau un răspuns puternic la creșterea concentrației de substrat, ci mai degrabă sunt sensibile la scăderi bruște ale acestor concentrații. Pentru majoritatea enzimelor constitutive, concentrația medie a substraturilor lor sunt apropiate de valorile K_m , astfel încât schimbările de concentrație să genereze schimbări corespunzătoare în fluxul metabolic. Răspunsul la schimbările nivelului substraturilor reprezintă o modalitate importantă dar *pasivă* de

coordonare a fluxului metabolic și de reglare a homeostaziei celulare, oferind o gamă limitată de răspunsuri la variațiile mediului de viață. Mecanismele care reglează *activ* activitatea enzimelor ca răspuns la stimulii interni și externi sunt discutate în continuare.

Fluxul metaboliților este unidirecțional. În ciuda oscilațiilor pe termen scurt în concentrațiile de metaboliți și enzime, celula vie există într-o stare dinamică de echilibru în care concentrațiile metaboliților rămân relativ constante în timp. În timp ce toate reacțiile chimice sunt măcar într-o oarecare măsură reversibile, în celulele vii producții unor reacții pot servi drept substraturi pentru alte reacții enzimatică. În acest fel, multe reacții reversibile ajung să aibă loc unidirecțional. Această succesiune de reacții metabolic intercorelate este însoțită de o schimbare globală în energia liberă care favorizează fluxul unidirecțional al metaboliților.

Compartimentalizarea asigură eficiența metabolică și simplifică reglarea. În eucariote, căile anabolice și catabolice care interconvertesc producții obișnuiți pot avea loc în compartimente celulare diferite. De exemplu, multe dintre enzimele care degradează proteinele și polizaharidele își au sediul în organite celulare numite lizozomi. Biosinteza acizilor grași are loc în citosol, pe când oxidarea o are loc în mitocondrii. Existența anumitor căi metabolice numai în unele celule specializate constituie o altă modalitate de compartimentalizare. Ca o alternativă, existența unuia sau mai multor *intermediari unici* permite unor căi metabolice aparent opuse să coexiste chiar în absența unor bariere fizice.

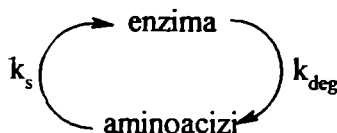
Controlarea unei enzime care catalizează o reacție determinantă de viteză reglează întreaga cale metabolică. În timp ce fluxul metaboliților prin căile metabolice implică nenumărate enzime, controlul activ al homeostaziei este asigurat prin reglarea unui număr redus de enzime. O enzimă ideală pentru intervenția reglatoare ar fi o enzimă a cărei cantitate sau eficiență catalitică ar face ca reacția pe care o catalizează să fie lentă comparativ cu altele din calea metabolică. Prin scăderea eficienței catalitice sau a cantității enzimei, deci reducând viteza acestei reacții, se reduce imediat fluxul de metaboliți din această cale, și viceversa. De exemplu, acetyl-CoA carboxilaza catalizează sinteza malonil-CoA în prima reacție din lanțul de reacții care duc la biosinteza acizilor grași. Când sinteza malonil-CoA este inhibată, reacțiile următoare din calea biosintezei acizilor grași încetează din cauza lipsei de substraturi. Enzimele care catalizează etapele determinante de viteză joacă rol de „guvernatori” naturali ai fluxului metabolic. Din această cale, ele reprezintă ținte eficiente pentru intervențiile reglatoare medicamentoase. De exemplu, inhibarea de către medicamentele din clasa „statinelor” a HMG-CoA reductazei, care catalizează etapa determinantă de viteză din calea colesterologenezei, reduce sinteza colesterolului.

5. 10. 1. Reglarea cantitativă a enzimelor

Capacitatea catalitică a reacției determinante de viteză dintr-o cale metabolică este determinată de concentrația enzimei și de eficiența catalitică intrinsecă. Rezultă deci că această capacitate catalitică poate fi influențată fie schimbând cantitatea de enzimă prezentă, fie modificându-i eficiența catalitică intrinsecă.

Controlul sintezei enzimei. Enzimele ale căror concentrații rămân relativ constante în timp se numesc **enzime constitutive**. Există însă multe alte enzime a căror concentrație depinde de prezența unor **inductori**, care sunt de obicei substraturi sau compuși înrudiți, care determină inițierea sintezei lor. De exemplu, bacteria *Escherichia coli* cultivată pe un mediu de cultură care conține glucoză catabolizează lactoză numai dacă se adaugă în mediu un β -galactozid, inductor care inițiază sinteza unei β -galactozidaze și a unei galactozid permeaze. Enzime inductibile umane sunt triptifan pirolaza, treonin dehidraza, tirozin α -cetoglutarat aminotransferaza, etc. Invers, excesul unui metabolit poate să reducă sinteza enzimei care îl produce prin **represie**. Atât inducția cât și represia presupun evenimente reglatoare la nivelul transcrierii de ADN.

Controlul degradării enzimelor. Cantitatea absolută a enzimelor reflectă echilibrul dintre sinteza și degradarea enzimelor:



unde k_s și k_{deg} reprezintă constantele de viteză pentru procesele globale de sinteză și respectiv degradare a enzimei. Într-un organism uman, au loc fluctuații atât ale k_s cât și ale k_{deg} .

Turnover-ul unei proteine reprezintă rezultatul net al sintezei și degradării lor. Măsurând ratele de incorporare a aminoacizilor marcați cu ^{15}N în proteine și ratele de pierdere a ^{15}N din proteine, Schoenheimer a ajuns la concluzia că proteinele organismului sunt într-o stare de „echilibru dinamic” în care sunt sintetizate și degradate continuu.

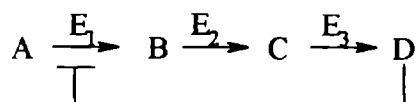
Nivelul enzimelor din țesuturile umane sunt reglate de o gamă întreagă de factori fiziologici, hormonal și nutriționali. De exemplu, hormonii glucocorticoizi determină creșterea concentrației de tirozin aminotransferază prin stimularea k_s , iar hormonul glucagon – în ciuda efectului fiziologic opus – îi măresc k_s de 4-5 ori. Reglarea arginazei hepatice presupune modificări atât în k_s cât și în k_{deg} . După o masă bogată în proteine, nivelul arginazei hepatice crește și sinteza argininei scade. Nivelurile arginazei cresc de asemenea la înfometare, dar în acest caz scade degradarea arginazei, pe când k_s

rămâne neschimbat. Injectarea cu hormoni glucocorticoizi și ingestia de triptofan determină ambele creșterea nivelului de triptofan oxigenază. În timp ce hormonul determină creșterea k_s pentru sinteza oxigenazei, triptofanul scade k_{deg} prin stabilizarea oxigenazei și mărirea rezistenței la degradarea proteolitică.

5.10.2. Reglarea activității catalitice

În organismele umane, inducerea sintezei proteice este un proces multifazic complex care necesită ore până se observă o creștere semnificativă în nivelul unei enzime. Din contră, modificări în eficiența catalitică intrinsecă efectuate prin legarea unor liganzi dissociabili (**reglare alosterică**) sau prin **modificări chimice** reușesc reglarea activității enzimatice în câteva secunde. Modificările cantitative ale enzimelor servesc necesităților pe termen lung, pe când modificările eficienței catalitice sunt cel mai potrivite pentru a răspunde schimbărilor rapide și tranzitorii din fluxul metabolic.

Reglarea prin factori alosterici. Inhibiția prin feedback reprezintă inhibiția unei enzime dintr-o cale metabolică de către produsul final al acelei căi metabolice. De exemplu, în biosinteza lui D din A catalizată de enzimele E_1 , E_2 , E_3 , concentrații mari de D inhibă conversia lui A în B.



Inhibiția rezultă din capacitatea lui D de a inhiba activitatea enzimei E_1 . În mod obișnuit, D se leagă de un **situs alosteric** care este *distinct de situsul catalitic al enzimei*. În acest exemplu, inhibitorul prin feedback D acționează ca **efector alosteric negativ** al enzimei E_1 .

Într-o cale biosintetică ramificată, reacția inițială participă la sinteza câtorva produși. Figura 33 reprezintă o cale biosintetică ramificată ipotetică, în care săgețile curbate pleacă de la inhibitorii prin feedback spre enzimele a căror activitate o inhibă. Secvențele $S_3 \rightarrow A$, $S_4 \rightarrow B$, $S_4 \rightarrow C$ și $S_3 \rightarrow \rightarrow D$ reprezintă fiecare o secvență liniară de reacții, fiecare inhibată prin feedback de către produșii finali.

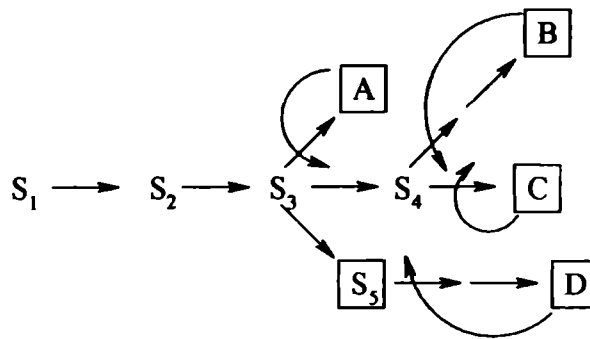


Figura 5.18. Siturile de inhibiție prin feedback dintr-o cale biosintetică ramificată. S_1 - S_5 reprezintă intermediari în biosinteza produșilor finali A-D. Săgețile drepte reprezintă enzimele care catalizează conversiile indicate. Săgețile curbe reprezintă buclele de feedback și indică locurile unde are loc inhibiția prin produs final

Cinetica inhibiției prin feedback poate fi competitivă, necompetitivă, parțial competitivă sau mixtă. Inhibitorii prin feedback sunt în cele mai multe cazuri molecule mici și acționează de obicei asupra primei etape importante dintr-o cale biosintetică. Reglarea fină a unei căi metabolice se face prin existența mai multor bucle feedback (Figura 5.19).

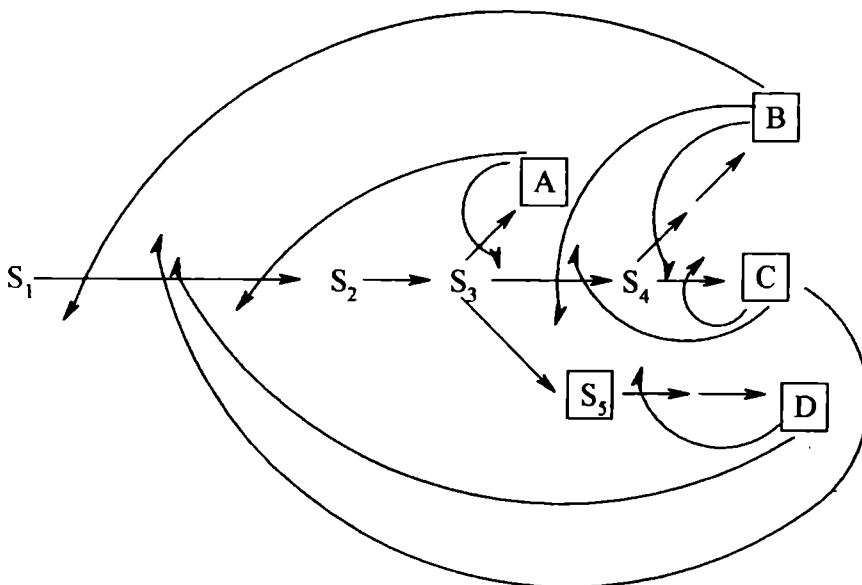


Figura 5.19. Inhibiția multiplă prin feedback într-o cale biosintetică ramificată. Reglarea fină a activității enzimelor comune în biosinteza câtorva produși finali se face prin suprapunerea peste buclele de feedback simple (săgețile curbe punctate) a buclelor de feedback multiple (săgeți curbe întregi).

După cum este prezentat în Figura 5.19, prezența în exces a produsului B duce la descreșterea necesarului de substrat S_2 . S_2 este însă necesar pentru sinteza lui A, C și D, așadar un exces de produs B ar trebui să ducă la reducerea sintezei lui A, C și D. Pentru a surmonta această dificultate potențială, fiecare dintre produșii finali inhibă numai parțial activitatea catalitică. Efectul a încă unul sau doi produși finali va fi aditiv, sau poate fi chiar mai mare decât suma efectelor individuale (inhibiție cooperativă prin feedback).

Lipsa oricărei similarități structurale între inhibitorii feedback și substraturile enzimei pe care aceștia o controlează indică faptul că acești efectori nu sunt **izosterici** cu substratul, ci **alosterici** („ocupă altă poziție”). Jacques Monod a fost cel care a postulat existența situsurilor alosterice care sunt distincte fizic de situsurile catalitice. **Enzimele alosterice** sunt acele enzime a căror activitate poate fi modulată de prezența efectorelor la nivelul situsurilor alosterice. Această ipoteză a fost confirmată de mai multe tehnici, inclusiv cristalografia cu raze X și mutageneza direcționată, demonstrându-se existența unor situsuri catalitice și alosterice distincte spațial.

Cinetica inhibiției alosterice. Inhibiția alosterică nu poate fi descrisă în totalitate corect nici ca inhibiție competitivă, nici necompetitivă. Există clar două clase de enzime alosterice: seria K și seria V. În cazul enzimelor alosterice din seria K, cinetica saturării cu substrat arată că inhibiția este competitivă în sensul că K_m crește fără a se observa efecte asupra V_{max} . În cazul enzimelor alosterice din seria V, inhibitorii alosterici determină scăderea V_{max} fără să afecteze K_m . Modificări ale V_{max} și K_m rezultă probabil prin modificări conformaționale care au loc la situsul catalitic în urma legării efectorelui alosteric de situsul alosteric. La enzimele alosterice din seria K, aceste modificări conformaționale slăbesc probabil legăturile dintre substrat și resturile de aminoacid implicate în legarea substratului. La enzimele alosterice din seria V efectul imediat este probabil modificarea orientării sau a sarcinii resturilor aminoacil catalitice, aceasta ducând la scăderea V_{max} . La ambele clase de enzime alosterice, se pot observa însă și efecte intermediare atât asupra V_{max} cât și K_m .

Reglarea prin feedback. Am văzut mai înainte cum produșii finali dintr-o cale metabolică își controlează sinteza prin inhibiție feedback a unei enzime care participă într-o fază incipientă a căii biosintetice. Trebuie făcută distincție între **reglarea feedback**, un termen fenomenologic lipsit de implicații mecanistice și **inhibiția feedback**, care reprezintă un mecanism de reglare a activității unei enzime. De exemplu, când colesterolul din alimentație scade sinteza de colesterol la nivelul ficatului, această reglare feedback nu implică și o inhibiție feedback. HMG-CoA reductaza, enzima care catalizează reacția determinantă de viteză din calea colesterologenezei este afectată, dar colesterolul nu inhibă această enzimă prin mecanism feedback. Reglarea ca răspuns la ingerarea alimentelor ce conțin

colesterol se face prin reducerea de către colesterol sau a unui metabolit al colesterolului a exprimării genei care codifică HMG-CoA reductaza.

Impulsurile nervoase, ca și legarea hormonilor de receptori hormonală situați la suprafața celulelor induc o serie de modificări în viteza reacțiile enzimatică în celulele-țintă prin inițierea sintezei sau eliberării unor efectori alosterici specializați numiți **mesageri secundari**. Mesagerul „primar” este reprezentat de impulsul nervos sau molecula de hormon. Mesagerii secundari includ 3',5'-cAMP, sintetizat din ATP sub acțiunea adenilat ciclazei ca răspuns la hormonul epinefrină. Un alt mesager secundar sunt ionii Ca^{2+} , care sunt stocați în reticulul endoplasmatic al majorității celulelor. Depolarizarea membranei ca răspuns la un impuls nervos deschide canale membranare care permit ionilor de Ca^{2+} să treacă în citoplasmă, unde se leagă și activează enzimele implicate în calea stimulată de impulsul nervos respectiv.

Reglarea prin modificări covalente. În celulele mamiferelor, cele mai importante forme de modificare covalentă sunt **proteoliza parțială** și **fosforilarea**. Deoarece celulele nu au capacitatea să reunească două fragmente proteice rezultate prin hidroliza unei legături peptidice, proteoliza constituie o **modificare ireversibilă**. Fosforilarea însă este o **modificare reversibilă**. Fosforilarea proteinelor la nivelul resturilor seril, treonil sau tirozil este catalizată de protein kinaze și este un proces favorizat din punct de vedere termodinamic, la fel ca și procesul invers de hidroliză a acestor grupări fosfat de către enzime numite fosfataze.

Modificări covalente ireversibile. Anumite proteine sunt sintetizate și secretate sub formă de precursori inactivi, numiți **proproteine**. Proproteina unei enzime se numește **proenzimă** sau **zimogen**. Proteoliza selectivă transformă o proproteină în proteina activă prin una sau mai multe tăieturi. Exemple de proteine sintetizate sub formă de proproteine sunt insulina (proproteina: proinsulina), enzimele digestive pepsina, tripsina și chimotripsina (proproteine: pepsinogen, tripsinogen și respectiv chimotripsinogen), unii factori implicați în controlul coagulării sângelui sau a resorbției cheagului, colagenul (proproteina: procologen).

Sinteza și secreția anumitor proteaze sub formă de proenzime inactive catalitic este o modalitate de protejare a țesutului de origine împotriva autodigestiei. (Autodigestia pancreasului poate apărea de exemplu în cazurile de pancreatită). Anumite procese fiziologice, cum ar fi digestia sunt intermitente, dar regulate și previzibile. Alte procese, cum ar fi formarea și resorbția cheagurilor de sânge și repararea tisulară apar numai ca răspuns la anumite necesități fiziopatologice, așa încât formarea și resorbția cheagurilor de sânge de exemplu trebuie coordonate temporar. Enzimele de care este nevoie numai intermitent, dar rapid, sunt deseori secretate sub formă inactivă, deoarece sinteza unei proteine mature poate cere mult timp, iar în cazuri de felul hemoragiilor, viteza de răspuns este esențială.

Proteoliza selectivă necesită una sau mai multe tăieturi care pot fi însoțite sau nu de separarea peptidelor rezultate. Proteoliza selectivă provoacă de cele mai multe ori și modificări conformaționale care „creează” situsul catalitic al unei enzime. În cazul α -chimotripsinei, His 57 și Asp102 se găsesc pe lanțul B, iar Ser 195 pe lanțul C (Figura 5.20). Modificările conformaționale care însoțesc proteoliza prochimotripsinei (chimotripsinogenului) aliniaza cele trei resturi într-o rețea-ștafetă de sarcină (Figura 5.7) și formarea situsului catalitic. Resturile aminoacil care intră în alcătuirea situsurilor de legare sau a situsurilor catalitice se pot găsi și pe lanțuri diferite, atâta timp cât structura conformațională a lanțurilor le permite coexistența spațială la distanțe mici.

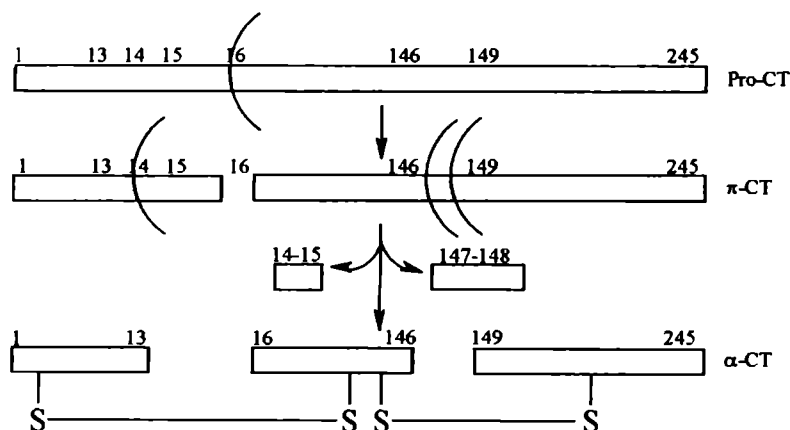


Figura 5.20. Proteoliza selectivă și modificările conformaționale asociate duc la formarea situsului activ al chimotripsinei, care include triada catalitică Asp102-His57-Ser195. Prin procese proteolitice succesive asupra prochimotripsinei (Pro-CT) se formează π -prochimotripsina (π -CT) și apoi α -prochimotripsina (α -CT), proteaza activă alcătuită din trei catene polipeptidice care rămân asociate prin legături disulfurice.

Modificări covalente reversibile. Proteinele mamiferelor sunt supuse unei game largi de modificări covalente. Prin procesele de glicozilare, hidroxilare, acilare, etc. se introduc noi caractere structurale într-o proteină nou formată care de obicei persistă pe toată durata de viață a proteinei. Printre modificările covalente care controlează funcțiile proteinelor (metilarea, adenilarea) cel mai adesea întâlnim fosforilarea-defosforilarea. **Protein kinazele** catalizează fosforilarea proteinelor prin transferul ultimei grupări fosfat din ATP la gruparea -OH a resturilor seril, treonil sau tirozil, formând restori O-fosfoseril, O-fosfotreonil și respectiv O-fosfotirozil (Figura 5.21).

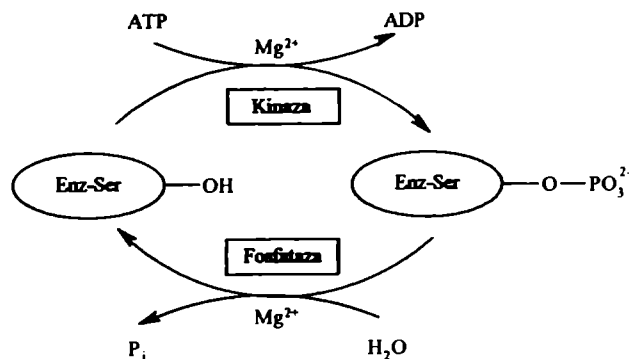


Figura 5.21. Modificări covalente a unei enzime reglate prin fosforilarea-defosforilarea unui rest de serină.

Unele protein kinaze acționează asupra resturilor histidil, lizil, arginil sau aspartil. Forma nemodificată a proteinelor poate fi regenerată prin îndepărtarea hidrolitică a grupărilor fosforil, catalizată de **protein fosfataze**.

O celulă tipică dintr-un organism de mamifer conține peste o mie de proteine fosforilate și câteva sute de protein kinaze și fosforilaze care le catalizează interconversia. Ușurința cu care anumite enzime trec din formele fosforilate în cele defosforilate și invers, explică în parte frecvența fosforilărilor-defosforilărilor ca mecanism de reglare. Procesele reversibile de fosforilare-defosforilare permit schimbarea funcțională a enzimelor numai atâta timp cât este necesar. Odată starea de necesitate îndepărtată, proteina revine la stare originală, fiind gata pentru a răspunde la un nou eveniment stimulat.

Al doilea factor care explică larga răspândire a proceselor de fosforilare-defosforilare constă în caracterul chimic al grupării fosfat. Pentru a modifica proprietățile funcționale ale enzimei, orice modificare chimică trebuie să afecteze configurația tridimensională a proteinei. Densitatea electronică mare a grupărilor fosfat legate de proteine (sarcină -2 la pH-ul fiziologic) și capacitatea lor de a forma punți ionice cu resturile arginil le conferă capacități mari de modificare a structurii și funcțiilor proteinelor. De regulă procesele de fosforilare-defosforilare ținesc regiunile îndepărtate de situsul catalitic. Modificările conformaționale care au loc influențează însă eficiența catalitică intrinsecă a enzimei sau alte proprietăți. În acest sens, situsurile de fosforilare pot fi considerate ca o altă formă de situsuri alosterice, numai ca în acest caz „ligandul alosteric” se leagă covalent.

Fosforilarea-defosforilarea proteinelor este un proces versatil și selectiv. Nu toate proteinele sunt supuse fosforilării, iar din multele grupări hidroxil de pe suprafața unei proteine, numai un mic număr sunt fosforilate. Cel mai adesea, procesele de fosforilare-defosforilare afectează activitatea

catalitică, dar ele pot modifica și alte proprietăți, cum ar fi afinitatea pentru substrat, localizarea intracelulară sau sensibilitatea la efectori alosterici.

6. Vitamine și Minerale

Vitaminele reprezintă un grup de nutrienți organici indispensabili în cantități mici pentru o serie de funcții biochimice; acești compuși nu pot fi sintetizați de organism, astfel încât ei trebuie furnizați prin alimentație.

Vitaminele liposolubile sunt compuși nepolari și hidrofobi care pot fi absorbiți eficient în condițiile absorbției grăsimilor. Ele sunt transportate în sânge, ca oricare alt lipid nepolar sub formă de lipoproteine, sau prin atașare de anumite proteine transportoare. Au o multitudine de roluri: vitamina A în procesul vederii; vitamina D în metabolismul calciului și fosfatului; vitamina E, antioxidant; vitamina K, în coagularea sângelui. Carențele alimentare sau condițiile care afectează digestia și absorbția vitaminelor liposolubile (steatoreea, deficiențe ale sistemului biliar) pot duce la apariția unor sindroame de deficiență, cum ar fi hemeralopia și xerofthalmia (carența de vitamina A); rahitismul la copii și osteomalacia la adulți (carența de vitamina D); disfuncții neurologice și anemii la noii-născuți (carența de vitamina E); hemoragii la noii-născuți (carența de vitamina K). Dacă un aport prea mic de vitamine liposolubile poate cauza perturbările enumerate mai sus, ingerarea unor cantități prea mari de vitamine poate fi toxică pentru organism, în special în cazul vitaminelor A și D. Vitamina A și β -carotenul (provitamina A) precum și vitamina E sunt agenți antioxidanți și pot avea un rol în ateroscleroză și în prevenirea cancerului.

Vitaminele hidrosolubile, care includ complexul B și vitamina C, joacă rol de coenzime sau cofactori în diverse reacții biochimice. Acidul folic acționează ca transportor de grupări organice cu un atom de carbon. Alimentația săracă în vitamine hidrosolubile poate duce la apariția unor sindroame specifice: boala beriberi (vitamina B₁), cheiloză, glosită, seborree (vitamina B₂), pelagra (niacina), nevrită periferică (vitamina B₆), anemia megaloblastică, aciduria metilmalonice, anemia pernicioasă (vitamina B₁₂), anemia megaloblastică (acidul folic), scorbut (vitamina C).

Elementele minerale necesare bunei funcționări a organismului de asemenea trebuie furnizate prin alimentație. Când aportul este insuficient, apar diverse simptome cum ar fi anemia (deficiență de fier), cretinism sau gușă (deficiență de iod). Când sunt prezente în cantități crescute, elementele minerale pot fi toxice și pot apărea reacții adverse (de exemplu intoxicații cu Se).

Vitaminele sunt substanțe naturale, diferite ca structură chimică și proprietăți, necesare organismului în doze foarte mici. Ele nu constituie pentru organism o sursă energetică sau plastică, fiind absolut necesare pentru asigurarea funcțiilor vitale. Aceste substanțe de origine animală, vegetală sau microbiană pătrund în organism prin alimentație. În general, cu mici excepții, organismul animal nu este capabil să sintetizeze aceste substanțe. Lipsa vitaminelor din alimentație conduce la **boli carentiale (hipovitaminoze)** – determinate de carențe vitaminice parțiale – și **avitaminoze** – determinate de lipsa totală a vitaminelor din alimentație. Avitaminozele se manifestă prin anumite „leziuni biochimice” asociate cu disfuncții metabolice, modificări structurale la nivelul unor țesuturi, îmbolnăviri severe și infertilitate. Aceste boli pot fi cauzate și de absorbția defectuoasă la nivelul intestinului, de consumul sporit (graviditate, efort fizic intens, boală, etc.) sau de prezența unor inhibitori specifici. Anumite vitamine se găsesc în mai multe variante structurale, numite **vitamere**.

Pentru toate substanțele nutritive, dar mai ales în cazul vitaminelor și a mineralelor, există anumite doze care între anumite limite sunt necesare pentru buna funcționare a organismului, pentru menținerea stării de sănătate și integritate metabolică. Ieșirea dincolo de aceste limite, fie în sus fie în jos, duce la boli carentiale sau la efecte toxice. Indivizi diferiți au necesități diferite de vitamine și

minerale, chiar când acesta sunt determinate raportat la greutatea corporală și la consumul energetic, existând o variație de $\pm 25\%$ în jurul valorilor medii. Pentru a stabili o dietă adecvată, este necesară stabilirea prin studii statistice a unui nivel de referință a dozelor care să asigure că nici un individ nu va suferi de carențe, dar nici nu va fi supus riscului de intoxicare datorită unei supradoze.

6.1. Clasificarea vitaminelor

Din punct de vedere structural, vitaminele aparțin unor clase de substanțe foarte diferite și singurul criteriu de diferențiere arbitrar al acestora este **solubilitatea**. Din acest punct de vedere se disting:

- **vitaminele liposolubile** (solubile în lipide și în solvenți organici): vitaminele A, D, E K.
- **vitaminele hidrosolubile** (solubile în apă): vitaminele B₁, B₂, B₆, B₁₂, B₁₅, acidul pantotenic, biotina, nicotinamida, acidul lipoic, acidul folic, acidul *para*-aminobenzoic, vitaminele P, vitamina C.

Denumirea uzuală a diferitelor vitamine poartă indicativul unei litere sau derivă de la efectele fiziologice pe care le determină, sau respectiv de la efectele produse prin carența lor (vezi Tabelul 6.1).

Tabelul 6.1. Vitamine, roluri principale și efecte carențiale.

Vitamina	Funcții	Boli și simptome carențiale
A (retinol, β -caroten)	Pigmenți vizuali în retină; reglarea exprimării genelor; reglarea diferențierii celulare; β -carotenul este antioxidant	Hemeralopie (cecităate nocturnă), xeroftalmie, keratinizarea pielii
D (calciferol)	Menține homeostazia calciului; mărește absorbția intestinală a Ca^{2+} ; mobilizează mineralele din oase	Rahitism = mineralizarea insuficientă a oaselor (la copii); osteomalacie = demineralizarea oaselor (la adulți)
E (tocoferol, tocotrienoli)	Antioxidant, în special la nivelul membranelor celulare	Extrem de rar – grave disfuncții neurologice
K (filochinone, menachinone)	Coenzimă în formarea γ -carboxiglutamului pentru enzimele implicate în coagularea sângelui și a formării matricei osoase	Boli hemoragice, coagulare deficitară a sângelui
B ₁ (tiamina)	Coenzimă pentru piruvat și α -cetoglutarat dehidrogenaze, pentru transcetolaze; rol slab elucidat în transferul influxului nervos	Distrugerii ale țesutului nervos periferial (boala beriberi), leziuni ale sistemului nervos central (sindromul Wernicke-Korsakoff)

B ₂ (riboflavină)	Coenzimă în reacții de oxidare și reducere; grupare prostetică pentru flavoproteine	Leziuni epidermice în colțul gurii, buze și limbă; dermatită seboreică
Niacina (acidul nicotinic, nicotinamida)	Coenzimă în reacții de oxidare și reducere; fragment funcțional în NAD ⁺ și NADP ⁺	Pelagra (dermatită fotosensibilă), psihoză depresivă
B ₆ (piridoxină, piridoxal, piridoxamină)	Coenzimă în reacțiile de transaminare și decarboxilare aminoacizilor, în fosforilarea glicogenului; rol în acțiunea hormonilor steroizi	Perturbări ale metabolismului aminoacizilor, convulsii
Acidul folic	Coenzimă în reacțiile de transfer ale grupărilor cu un atom de carbon	Anemia megaloblastică
B ₁₂ (cobalamina)	Coenzimă în reacțiile de transfer ale grupărilor cu un atom de carbon și în metabolismul acidului folic	Anemia pernicioasă = anemia megaloblastică cu degenerarea măduvei spinării
Acidul pantotenic	Fragment funcțional în CoA și proteina transportoare de grupări acil; sinteza și degradarea acizilor grași	
H (biotina)	Coenzimă în reacțiile de carboxilare în gluconeogeneză și sinteza acizilor grași	Deregări ale metabolismului lipidelor și carbohidraților; dermatită
C (acidul ascorbic)	Coenzimă în reacțiile de hidroxilare a prolinei și lizinei în procesul de sinteză a colagenului; antioxidant; potențează absorbția de fier	Scorbut (vindecarea întârziată a rănilor, pierderea cementului dentar, hemoragii subcutanate)

Majoritatea vitaminelor hidrosolubile dețin un rol major în reacțiile biochimice catalizate de enzime, funcționând în calitate de **coenzime**. Vitaminele cu rol de coenzime participă direct la reacțiile enzimatică, fie ca vitamine propriu-zise, fie ca derivați ai acestora sub formă de esteri fosforici, esteri pirofosforici, nucleotide; aceste vitamine cu funcții de conenzime intervin în reacții de oxidoreducere sau de transfer al unor grupări chimice. Unele vitamine participă direct (fără mediere enzimatică) în procesele de oxidoreducere din organism (vitamina C, E, K, biotina). În Tabelul 6.2 sunt prezentate câteva din exemplele mai reprezentative ale corelației vitamine-enzime.

Tabelul 6.2. Vitamine cu funcții de coenzime și tipurile de reacții enzimatică la care participă

Vitamină	Coenzimă	Tipul de reacție	Gruparea transferată
B ₁	Tiamin pirofosfat	Transfer grupare acil	R-CO
B ₂	Flavin adenin mononucleotid (FMN), flavin adenin dinucleotid (FAD)	Oxido-reducere	H
Niacina	Nicotinamid adenin dinucleotid (NAD ⁺), Nicotinamid adenin dinucleotid fosfat (NADP ⁺)	Oxido-reducere	H
B ₆	Piridoxal fosfat	Transaminarea aminoacizilor	-NH ₂
Acidul folic	Tetrahidrofolat (FH ₄)	Transfer de fragmente monocarbonate	-CH ₂ OH, CO ₂ , -CH ₃ , -CHO
B ₁₂	B ₁₂	Conversia metil-malonil CoA	Rearanjare intramoleculară (transpoziție)
Acidul pantotenic	Coenzima A	Activare și transfer de grupări acil	R-CO
Biotină	Biotină	Fixare CO ₂	CO ₂
Acidul lipoic	Acidul lipoic	Transfer grupare acil	R-CO

Există compuși care au o structură asemănătoare cu cea a vitaminelor – **antivitamine** – care prin inhibiție competitivă împiedică încorporarea vitaminelor în sistemele enzimatică în care joacă rolul de coenzime, afectează sistemele enzimatică la care participă vitaminele, deturneză evoluția normală a unor procese biochimice cu repercusiuni defavorabile asupra bunei funcționări a organismului. Antivitamine pot fi unele antibiotice, sulfonamide, sau chiar unele enzime care inactivează unele vitamine, cum ar fi ascorbaza (acționează asupra vitaminei C), tiaminaza (acționează asupra vitaminei B₁), lipoxigenaza (oxidează provitaminele A).

6.2. Vitaminele liposolubile. Din această categorie fac parte vitaminele A, D, E, K, având ca o caracteristică esențială insolubilitatea în apă și solubilitatea în solvenți organici. Vitaminele din această categorie fac parte din clasa terpenoidelor (izoprenoidelor) și reprezintă compuși intermediari în sinteza colesterolului.

6.2.1. Vitamina A

Vitaminele A sau **retinoizii** se găsesc în natură sub formă de provitamine, care fac parte din clasa **carotenoizilor**, de origine exclusiv vegetală. Plantele nu sintetizează retinoizi, prezența acestora în diferite țesuturi animale rezultând din transformarea provitaminelor ingerate.

Retinoizii includ **retinolul**, **retinaldehida (retinalul)** și **acidul retinoic**. Carotenoizii includ **carotenii** și alți compuși înrudiți. Ei sunt cunoscuți și sub numele de provitamine A, deoarece pot fi clivați cu obținere de retinaldehidă, și de aici retinol și acid retinoic. α -, β -, γ -Carotenii și criptoxantina sunt cei mai abundenți carotenoizi.

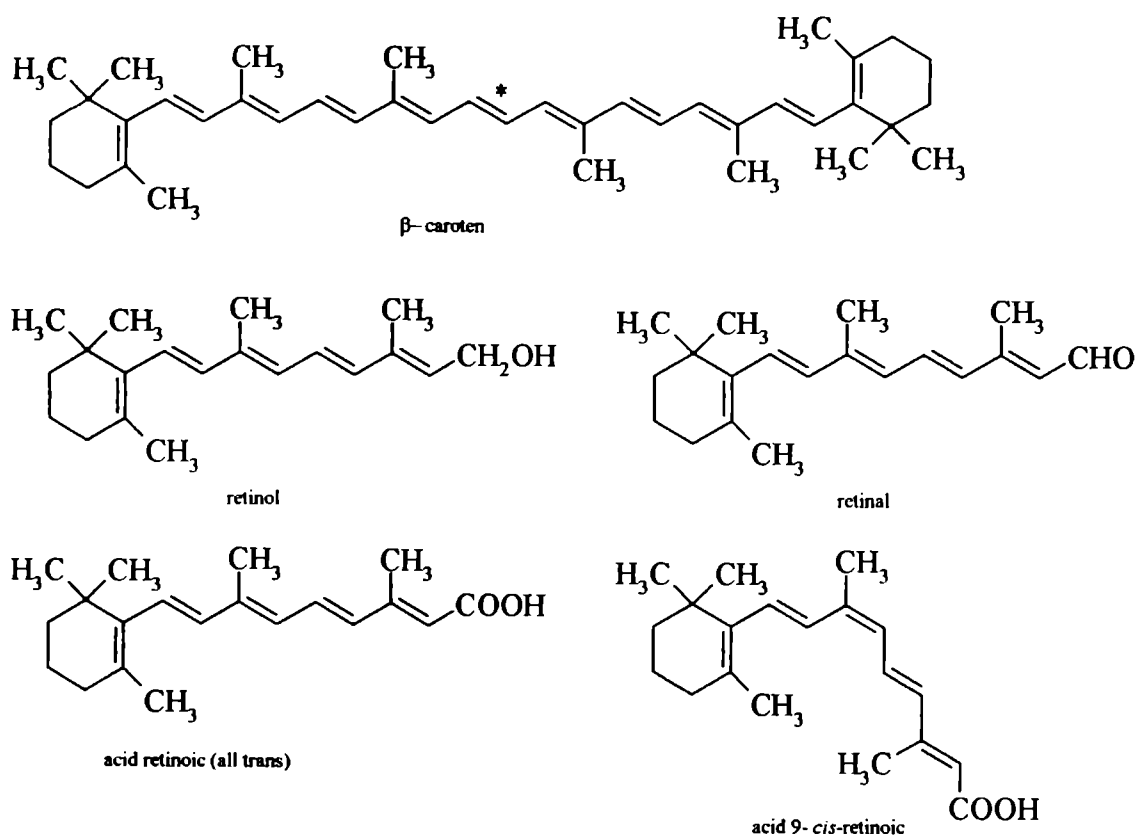


Fig. 6.1. β -Carotenul și principalele vitamere A. Asteriscul reprezintă situsul de clivare a β -carotenului în două molecule de retinal de către caroten dioxigenază

Deși dintr-o moleculă de β -caroten ar trebui să rezulte două molecule de retinol, s-a constatat că din 6 μg de β -caroten rezultă echivalentul a 1 μg retinol. Din această cauză, cantitatea totală de vitamina A din alimente se exprimă ca echivalenți de retinol.

β -Carotenul ca și alte provitamine A sunt clivate în mucoasa intestinală de către caroten dioxigenază până la retinal, care e redus la retinol. Retinolul este esterificat și secretat sub formă de chilomicroni împreună cu esterii ai retinolului provenit din alimentație. Activitatea caroten dioxigenazei intestinale este scăzută, astfel că mare parte din β -carotenul ingerat apare în circulație netransformat. Atacul caroten dioxigenazei se face în special asupra legăturii centrale a β -carotenului, însă pot avea loc și clivări asimetrice. Astfel, se pot forma și 8'-, 10'- sau 12'-apo-carotenali, care sunt oxidați la acid retinoic, dar nu pot fi utilizați ca surse de retinal sau retinol.

Rolul vitaminei A în procesul vederii

La nivelul retinei, retinalul funcționează ca grupare prostetică pentru proteinele fotosensibile numite opsine, formând **rodopsina** (în celulele cu bastonașe) și **iodopsina** (în celulele cu conuri). O celulă cu conuri conține numai un singur tip de opsină și este sensibilă numai la o singură culoare. În epitelul pigmentat al retinei, retinolul este izomerizat la 11-*cis*-retinol care este oxidat la 11-*cis*-retinal. Aceasta se condensează cu un rest de lizină din opsină, formând rodopsina. După cum se vede în Figura 37, absorbția luminii de către rodopsină induce izomerizarea retinalului de la 11-*cis* la 11-*trans*, provocând modificări conformaționale în structura opsinei. Aceste modificări duc la eliberarea retinalului din legătura cu proteina și inițierea impulsului nervos. Formarea batorodopsinei (forma inițială de rodopsină excitată) are loc în câteva picosecunde de la iluminare. Urmează apoi o serie de modificări conformaționale care duc la formarea metarodopsinei II, care inițiază o amplificare în cascadă mediată de guanin nucleotid trifosfat (GTP) și ulterior impulsul nervos. Etapa finală este hidroliza care eliberează retinalul și opsina. Cheia pentru inițierea ciclului vizual este prezența 11-*cis*-retinalului, deci în primă instanță a vitaminei A. În cazul carenței în vitamina A sunt perturbate atât vederea la lumină slabă, cât și timpul de adaptare la întuneric.

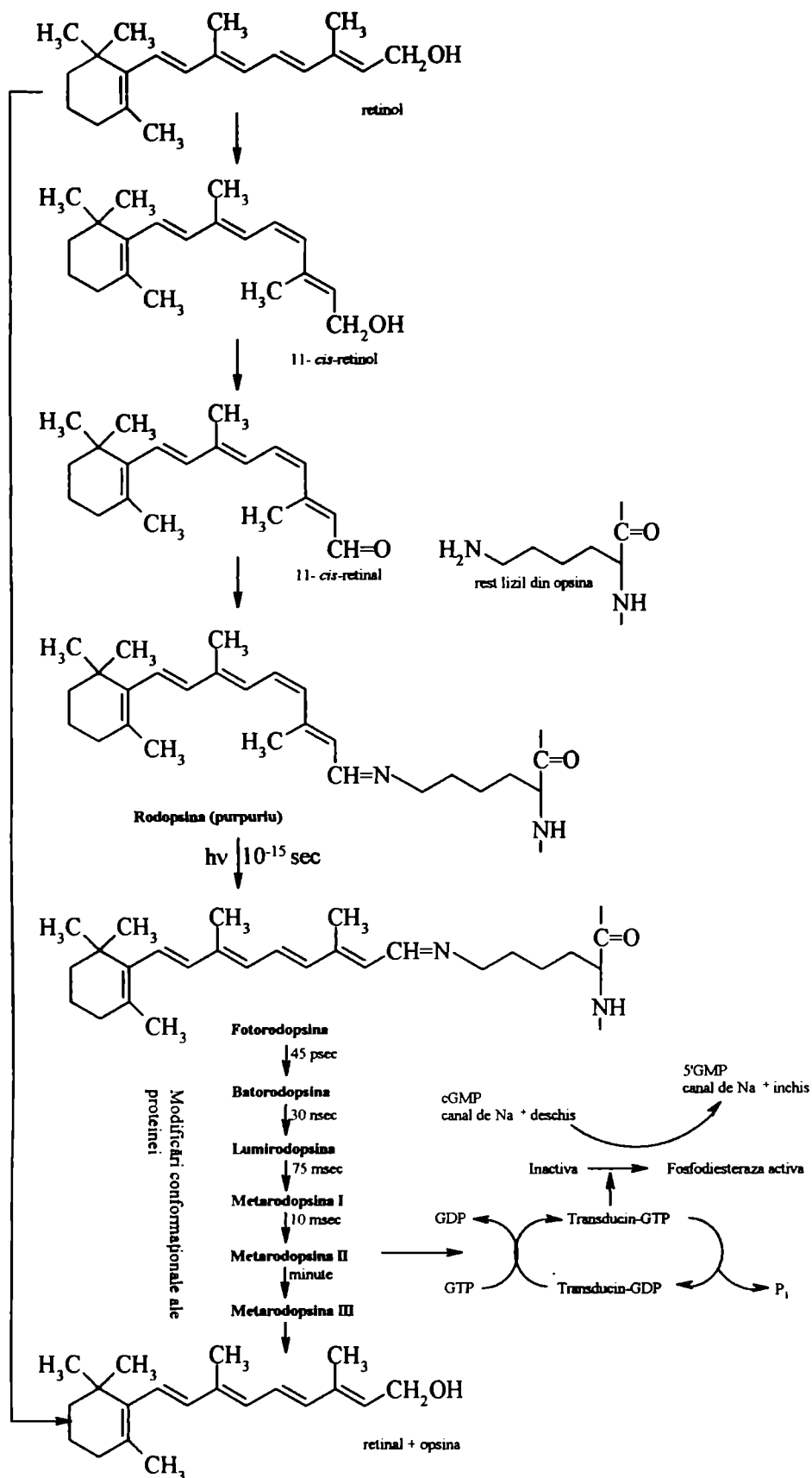


Figura 6.2. Rolul retinalului în procesul vederii

Rolul acidului retinoic

O altă funcție importantă a vitaminei A este controlul diferențierii celulare. Acidul retinoic (*all trans*) și acidul 9-*cis*-retinoic (Figura 6.2) sunt implicați în reglarea creșterii, dezvoltării și diferențierii țesuturilor. Cei doi acizi au acțiuni cu specificitate de țesut. La fel cu hormonii steroizi sau vitamina D, acizii retinoici se leagă de receptori nucleari care induc transcripția unor anumite gene. Există două familii de receptori retinoizi: RAR (retinoic acid receptors) care leagă acidul *trans*-retinoic sau acidul 9-*cis*-retinoic, și RXR (retinoid X receptors) care leagă numai acidul 9-*cis*-retinoic.

Efectele carenței. Carența în vitamina A poate fi consecința unei alimentații sărace în provitamine, a unor defecte de absorbție a vitaminelor și a provitaminelor sau imposibilității conversiei provitaminelor în vitamine. La om carența se manifestă prin mai multe semne clinice, care după gravitatea lor au fost denumite: **hemeralopie (cecitate nocturnă), xerofthalmie și keratomalacie**. Simptomele inițiale ale carenței constau în pierderea sensibilității la lumina verde, urmată de tulburări în adaptarea la lumină slabă și în final de cecitate nocturnă. Hemeralopia sau „orbul găinilor” se manifestă prin aceea că bolnavii nu mai sunt capabili să se orienteze în lumina crepusculară. Dacă avitaminoza A este accentuată sau de lungă durată, edemului retinian îi urmează modificări degenerative mai mult au mai puțin grave: uscarea conjunctivei, sclerozarea corneei, orbirea; această stare este cunoscută sub denumirea de xerofthalmie. Keratomalacia este determinată de o avitaminoză A avansată și se manifestă prin înmuierea și sclerozarea corneei, concomitent cu o atrofie și o regresie a globului ocular. Vitamina A are un rol important și în diferențierea celulelor din sistemul imunitar, deci o carență va provoca o creștere a susceptibilității organismului la boli infecțioase. Mai mult decât atât, în cazul infecțiilor, sinteza proteinei care leagă și transportă retinolul este redusă, ceea ce duce la o scădere și mai mare a retinolului circulant și implicit a răspunsului imun.

Efectele hipervitaminozei. Organismul uman are o capacitate limitată de a metaboliza vitamina A, astfel încât ingerarea peste măsură duce la acumularea vitaminei peste capacitatea de legare a proteinelor transportoare. Vitamina A liberă (în exces) provoacă distrugerii ale țesuturilor. Hipervitaminoza A afectează sistemul nervos central (dureri de cap, greață, ataxie, anorexie, toate asociate cu presiunea crescută a lichidului cerebrospinal), ficatul (hepatomegalie cu modificări tisulare și hiperlipidemie), homeostazia calciului (îngroșarea oaselor lungi, hipercalcemie, calcefierea țesuturilor moi), epiderma (uscare excesivă, descuamare, alopecie).

Surse de vitamina A. Atât în organismul animal cât și în plante se pot găsi diverși carotenoizi, dintre care unii au proprietăți de provitamine A. Surse bogate în provitamine A sunt: ulei de pește, unt, ouă, brânză, ficat, morcovi, ulei de palmier, tomate, cartofi.

6.2.2. Vitamina D (calciferolii)

Vitamina D nu este în sensul strict o vitamină, deoarece poate fi sintetizată în piele, și în cele mai multe cazuri aceasta constituie principala sursă pentru organismul uman. O suplimentare prin alimentație este totuși necesară atunci când expunerea la lumina solară este insuficientă. Principala funcție a vitaminei D este reglarea absorbției și homeostazei calciului. Acțiunea sa este mediată de receptori nucleari care reglează transcripția genelor. Carența în vitamina D – care provoacă rahitismul la copii și osteomalacia la adulți – continuă să fie o problemă în țările nordice, unde expunerea la soare este insuficientă.

Sinteza vitaminei D are loc la nivelul tegumentului. Aici, 7-dehidrocolesterolul (un intermediar în sinteza colesterolului, care se acumulează în piele) suferă o reacție neenzimatică prin expunere la lumina ultravioletă, obținându-se provitamina D. Aceasta suferă apoi o transformare lentă (câteva ore) în vitamina propriu-zisă, numită și colecalciferol, care este preluată de fluxul sanguin.

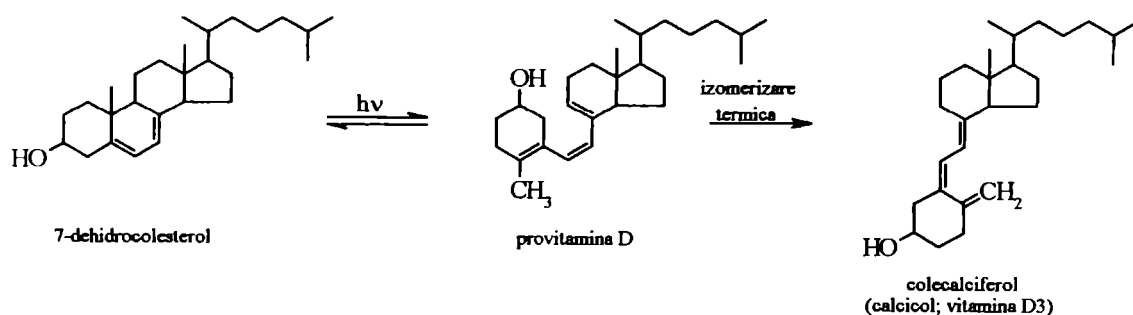


Figura 6.3. Sinteza vitaminei D în piele.

În țările cu climă temperată, concentrația plasmatică a vitaminei D atinge un maxim la sfârșitul verii și un minim la sfârșitul iernii. Dincolo de 40 de grade latitudine (nordică sau sudică) în timpul iernii radiația ultravioletă de frecvență necesară transformării 7-dehidrocolesterolului este foarte slabă.

Colecalciferolul endogen sau din alimentație este transformat în forma sa metabolic activă, calcitriolul, la nivelul ficatului și a rinichiului.

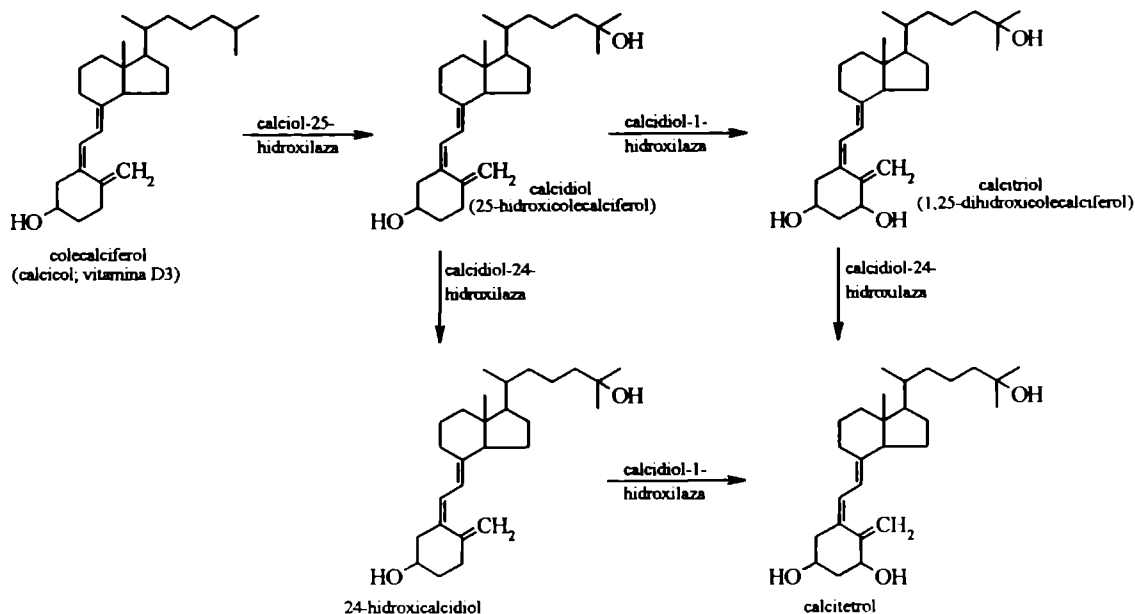


Figura 6.4. Metabolismul vitaminei D.

În ficat, colecalciferolul este hidroxilat la calcidiol (derivatul 25-hidroxi). Calcidiolul este eliberat în circulație legat de o globulină („vitamin D-binding globulin”), aceasta fiind forma principală de depozitare a vitaminei. În rinichi, calcidiolul suferă fie o hidroxilare în poziția 1 pentru a da 1,25-dihidroxivitamina D (calcitriol, metabolit activ) fie în poziția 24, când rezultă un metabolit inactiv, 24,25-dihidroxivitamina D (24-hidroxicalcidiol, Figura 6.4). Ergocalciferolul din alimente suferă hidroxilări similare până la ercaltitriol.

Principala funcție a vitaminei D este de a controla homeostazia calciului. La rândul său, metabolismul vitaminei D este reglat de factori care sunt sensibili la variații ale concentrațiilor plasmatice de calciu și fosfat. Calcitriolul de exemplu își controlează propria sinteză prin inducerea 24-hidroxilazei și represia 1-hidroxilazei la nivelul rinichiului. Principala sa funcție este de a menține constantă concentrația plasmatică de calciu. Calcitriolul realizează reglarea calciului pe trei căi: mărește absorbția intestinală de calciu, reduce excreția calciului (prin stimularea resorbției la nivelul tubulilor renali distali) și mobilizează mineralele din oase. Pe lângă acestea, calcitriolul este implicat și în secreția de insulină, sinteza și secreția hormonilor paratiroidieni și tiroidieni, inhibarea producerii de interleukină de către limfocitele T activate, inhibarea producerii de imunoglobuline de către limfocitele B activate, diferențierea precursorilor monocitari, modularea proliferării celulare. Astfel, calcitriolul se comportă ca un **hormon steroidic**.

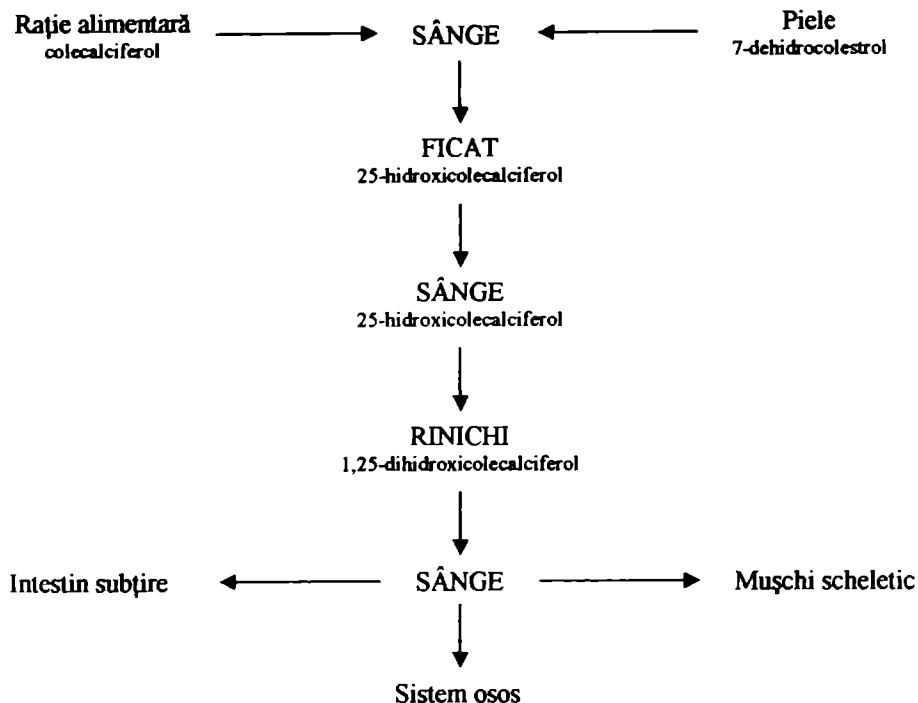


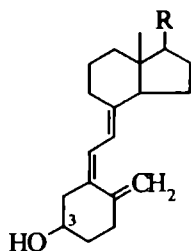
Figura 6.5. Circulația vitaminei D în organism.

Efectele carenței. Carența în vitamina D provoacă la copii rahitismul, caracterizat printr-o mineralizare întârziată a oaselor cauzată de o absorbție defectuoasă a calciului. Probleme similare apar și la adolescenții care sunt carențați în timpul exploziei de creștere. La adulți, carența provoacă osteomalacia, care se manifestă prin demineralizarea oaselor, tetanie (datorită scăderii accentuate a calcemiei), iritabilitate accentuată. Apare în special la femeile care au avut câteva sarcini și nu au fost expuse la soare suficient. Deși vitamina D este importantă pentru prevenirea și tratarea osteomalaciei la bătrâni, sunt puține observații care să sugereze că vitamina D ar fi benefică în tratamentul osteoporozei.

Efectele hipervitaminozei. Unii sugari prezintă o sensibilitate crescută chiar la doze mici de vitamina D, cu apariția unor concentrații crescute de calciu plasmatic, care poate provoca contracția vaselor sangvine, tensiune arterială mare și calcinoză (calcefierea țesuturilor moi). Deși excesul de vitamina D în alimentație este toxic, expunerea prelungită la soare nu conduce la o hiperacumulare a vitaminei D, deoarece capacitatea de formare a precursorului 7-dehidrocolesterol este limitată, ca și capacitatea de a prelua colecalfiferolul din piele.

Surse de vitamina D. Vitamilele D se găsesc răspândite în cantități mici sub formă de provitamine derivând de la micosteroli (ciuperci), fitosteroli (plante) și zoosteroli (animale). Surse importante de vitamine D sunt untura de pește, uleiul de ficat de morun, gălbenușul de ou, ficatul de

vită, untul. Aportul exogen de calciferoli este scăzut la om, pentru care cei mai importanți calciferoli sunt ergocalciferolul (vitamina D₂) și mai ales colecalciferolul (vitamina D₃). Structura generală a



vitaminelor D este:

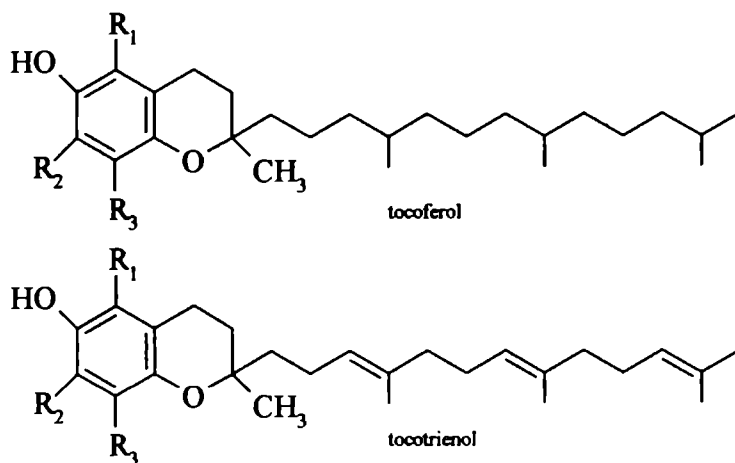
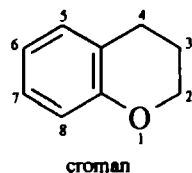
Pentru activitatea biologică sunt necesare: prezența grupării OH în poziția 3; ciclul B provenit de la sterolii de origine să fie deschis; prezența a trei legături duble conjugate. În Tabelul 6.3 sunt prezentate structurile și denumirile câtorva calciferoli.

Tabelul 6.3. Structura și denumirea calciferolilor

Vitamina	Provitamina	Denumirea	Structura R
D ₂	Ergosterol	Ergocalciferol	
D ₃	7-Dehidrocolesterol	Colecalciferol	
D ₄	22-Dihidroergosterol	Dihidroergocalciferol	
D ₅	7-Dehidrositosterol	Dehidrositocalciferol	
D ₆	7-Dehidrostigmasterol	Dehidrostigmacalciferol	

6.2.3. Vitamina E

Vitamina E reprezintă denumirea generică pentru două familii de compuși, **tocoferolii** și **tocotrienolii**. Sunt substanțe de origine vegetală care intervin în procesul de fertilitate fiind denumite și **factorii antisterilității**. Sunt compuși chimici derivați de la **croman** (dihidrobenzopiran).



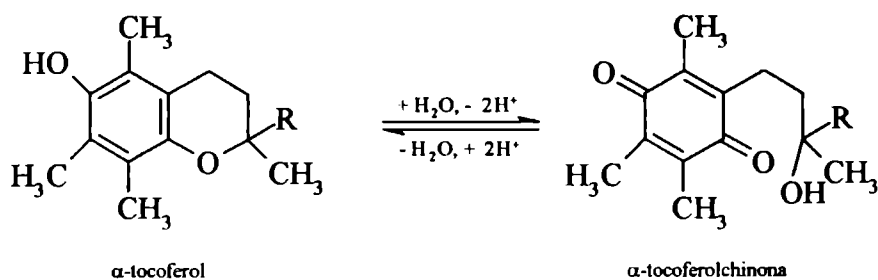
Nu a fost definită o funcție unică neechivocă a vitaminei E, ea având rol de antioxidant liposolubil la nivelul membranelor celulare. Vitamerii vitaminei E au potențe biologice diferite, în funcție de structura lor. Cel mai activ vitamer este (+)- α -tocoferolul, astfel încât necesitățile de vitamină E se exprimă în miligrame de echivalenți de (+)- α -tocoferol. ($\pm$)- α -tocoferolul sintetic nu are aceeași activitate biologică cu cel natural.

Tabelul 6.4. Constutuația chimică a vitamerilor E

Vitamer	R ₁ (5)	R ₂ (7)	R ₃ (8)
Alfa (α)	CH ₃	CH ₃	CH ₃
Beta (β)	CH ₃	H	CH ₃
Gamma (γ)	H	CH ₃	CH ₃
Delta (δ)	H	H	CH ₃
Epsilon (ϵ)	H	CH ₃	H
Zeta (ζ)	CH ₃	CH ₃	H

Vitamina E este denumită și vitamina antisterilității, deoarece lipsa ei determină la bărbați sterilitatea ireversibilă, iar la femei întârzierea dezvoltării embrionului și avortul. Activitatea antisterilică maximă o are α -tocoferolul și scade în ordinea $\alpha > \beta > \gamma > \delta$.

Vitamina E manifestă activitate antioxidantă, protejând acizii grași, retinolii și carotenii contra oxidării și formării de peroxizi. Proprietatea antioxidantă și de participare ca transportori de hidrogen în procesele de oxidoreducere se bazează pe următoarea reacție reversibilă care se petrece cu deschiderea ciclului piranic și trecerea de la forma croman la forma chinonă.



Activitatea antioxidantă scade în sens invers activității antisterilice ($\alpha < \beta < \gamma < \delta$).

Vitamina E acționează ca un antioxidant ce captează radicalii liberi în membranele celulare și lipoproteinele plasmatic. Ea reacționează cu radicalii peroxid lipidici formați prin peroxidarea acizilor grași polinesaturați, înainte ca aceștia să inițieze o reacție în lanț.

Radicalul liber tocoferoxil este relativ stabil și în cele din urmă formează compuși neradicalici. În mod normal, radicalul tocoferoxil este redus la tocoferol printr-o reacție cu vitamina C din citoplasmă. Radicalul monodehidroascorbat rezultat suferă apoi o reacție (enzimatică sau neenzimatică) de disproporționare, cu formare de ascorbat și dehidroascorbat, ambii produși neradicalici. Stabilitatea mare a radicalului tocoferoxil are o semnificație biologică mare, permițându-i acestuia să pătrundă în celule, unde eventual poate iniția reacții în lanț. Prin urmare, vitamina E poate avea, ca și alți antioxidanți, potențial pro-oxidant, în special la concentrații mari. Acest fapt poate explica de ce, deși cercetările au arătat o corelare între concentrația sangvină mare a vitaminei E și incidența scăzută a aterosclerozei, rezultatele obținute prin administrarea unor doze mari de vitamina E au fost foarte slabe.

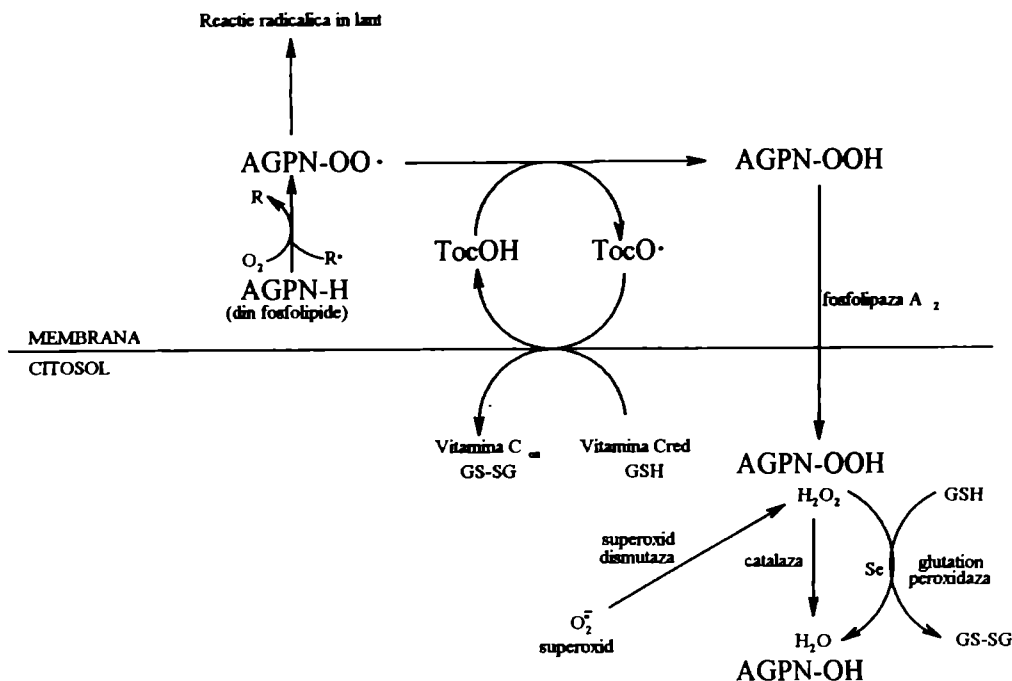


Figura. 6.6 . Interacțiunile și sinergismul dintre sistemele antioxidante care operează în faza lipidică (la nivelul membranei celulare) și în faza apoasă (citosol). R= radical liber; AGPN-OO $^\bullet$ = radicalul liber peroxil al unui acid gras polinesaturat din fosfolipidele membranare; AGPN-OOH = hidroxiperoxidul unui acid gras polinesaturat eliberat din fosfolipidele membranare în citosol prin acțiunea fosfolipazei A₂; AGPN-OH = hidroxi-acid gras polinesaturat; TocOH = vitamina E (α -tocoferol); TocO $^\bullet$ = radicalul liber al α -tocoferolului; Se = seleniu; GSH = glutation redus; GS-SG = glutation oxidat, care trece în starea redusă după reacția NADPH-dependentă catalizată de glutation reductază; AGPN-H = acid gras polinesaturat.

Efectele carenței. La animalele de laborator, carența în vitamina E duce la resorbții ale fetoșilor și atrofii testiculare. La om, carența alimentară de vitamina E este practic necunoscută. La pacienții cu deficiențe în absorbția lipidelor, fibroză cistică sau anumite boli hepatice cronice, se observă o carență datorată incapacității lor de a absorbi și transporta vitamina E. În aceste cazuri se observă leziuni la nivelul membranelor celulelor nervoase și musculare. Copiii prematuri se nasc cu rezerve insuficiente de vitamina E. În cazul lor, membranele eritrocitare sunt deosebit de fragile din cauza peroxidării, lucru care duce la apariția anemiei hemolitice.

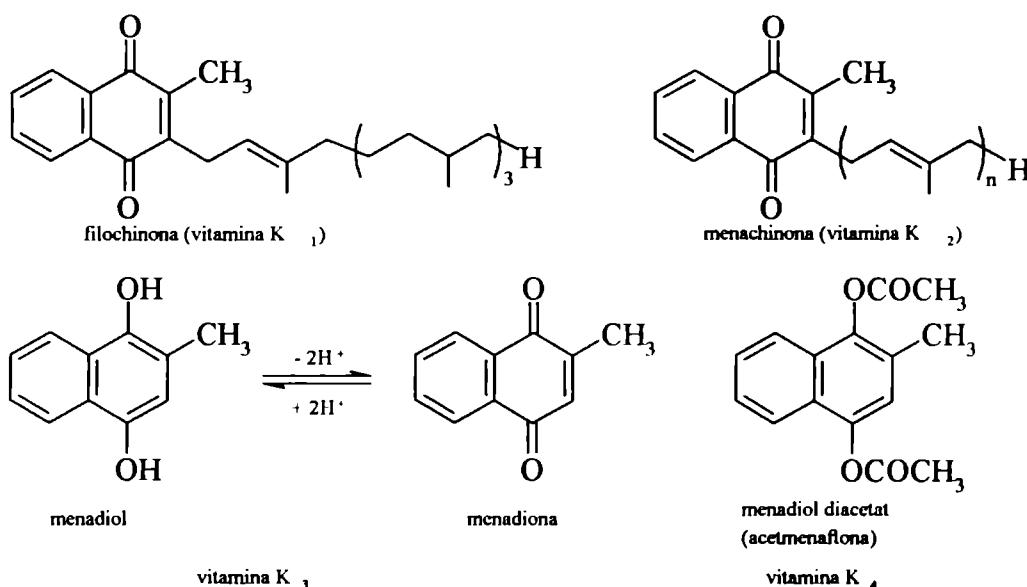
Stare naturală. Vitaminele E sunt foarte răspândite în natură în toate plantele verzi, precum și în unele microorganisme producătoare de clorofilă. Sursa cea mai bogată în vitamina E o constituie uleiurile vegetale, în care conținutul de vitamina E este proporțional cu cantitatea de acizi grași nesaturați. În organismele animale, tocoferolii provin din alimentație, predominând în țesutul adipos și în glandele suprarenale; în organismul feminin se găsesc cantități globale de vitameri E mai mari decât în cel masculin.

Surse de vitamina E. Alimente bogate în vitamina E sunt: uleiurile vegetale, uleiul din ficat de pește, rinichiul de vită, gălbenușul de ou, usturoiul, pătrunjelul.

6.2.4. Vitamina K

Vitamina K reprezintă denumirea generică pentru vitamerle **coagulării (antihemoragice)**; lipsa lor determină predispoziții la **hemoragii** (diateze hemoragice) datorită prelungirii timpului de coagulare a sângelui. Sunt sintetizate de părțile verzi ale plantelor sau de către flora microbiană a intestinului gros. Flora microbiană constituie o importantă sursă de vitamina K pentru organismele umane și animale, care devin astfel mai puțin expuse carenței vitaminice K.

Există trei compuși cu activitate biologică de vitamină K: **filochinona** (sursa obșnuită, se găsește în majoritatea plantelor); **menachinona** (sintetizate de bacteriile intestinale, prezintă catene laterale cu lungimi diferite); **menadiona**, **menadiolul** și **menadiol diacetatul** (compuși sintetici care pot fi metabolizați la filochinone).

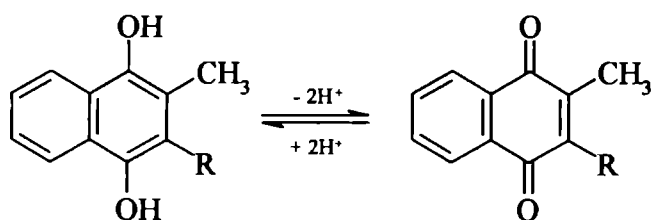


Filochinona și menachinona sunt compuși liposolubili; menadiona, menadiolul și menadiol diacetatul sunt compuși sintetici hidrosolubili ce au acțiune de vitamină K.

Rolul fundamental al vitaminelor K în procesul de coagulare a sângelui este posibil datorită participării acestora în biosinteza protrombinei. Nivelul scăzut al protrombinei (asociat cu diminuarea factorilor VII, IX și X) determină creșterea timpului de coagulare a sângelui (de la 12-15 sec la 30 sec)

și fenomene hemoragice. Ciroza sau alte afecțiuni hepatice dau efecte de avitaminoză K, deoarece scade capacitatea ficatului de a sintetiza trombină. Nou născuții, în primele zile după naștere, nu au vitamina K, motiv pentru care hemoragiile sunt extrem de periculoase. Din această cauză, se administrează preventiv vitamina K mamei înainte de naștere, precum și copilului, imediat după naștere. Deoarece flora intestinală sintetizează o parte din necesarul de vitamina K, tratamentul cu antibiotice, bacteriostatice sau bactericide determină o hipotrombinemie; din această cauză tratamentul de mai sus se asociază cu vitamine din complexul B, care au rolul de protecție a florei intestinale.

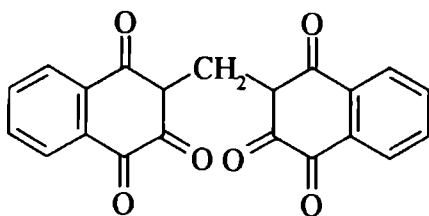
Vitaminele K intervin și în reacții de oxidoreducere și participă în procesele de respirație celulară, funcționând ca transportor de hidrogen cu localizare între dehidrogenazele NADH-dependente și citocromi.



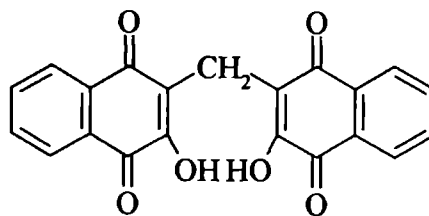
Antivitamine K. Antivitaminele K sunt substanțe cu structură asemănătoare vitaminelor K, dar care exercită o acțiune fiziologică antagonistă. Principalii compuși cu acțiune antivitaminică K fac parte din tre grupe:

- 1) derivați de la cumarină: dicumarol, warfarină;
- 2) derivați de la indanion: 2-fenil indaniona;
- 3) compuși de sinteză: diftiocolul, 2-clor-1,4-naftochinona.

Acești compuși sunt folosiți în clinică în cazuri de tromboze (flebite, embolii, etc.), când este necesar să se întârzie coagularea sângelui, deoarece cheagurile formate spontan produc accidente grave, uneori mortale.



dicumarol



diftiocol

Rolul vitaminei K în carboxilarea post-translațională a glutamatului. Vitamina K joacă rol de coenzimă în reacțiile de carboxilare post-translațională a resturilor glutamat din proteinele chelatoare de calciu. Prin această carboxilare rezultă aminoacidul mai puțin obișnuit, γ -carboxiglutamatul (Gla) care are preoprietatea de a chela ionii de calciu. Într-o primă fază, forma hidrochinonică a vitaminei K este oxidată la epoxid, care activează un rest glutamat din structura proteinei, obținându-se un carbanion. Acest carbanion reacționează neenzimatic cu CO_2 , rezultând γ -carboxiglutamatul (Figura 6.7).

Epoxidul vitaminei K este redus la forma chinonică de către o reductază sensibilă la warfarină, iar chinona este redusă la forma hidrochinonică (forma activă) fie de către aceeași reductază sensibilă la warfarină, fie de către o chinon reductază insensibilă la warfarină. În prezența warfarinei, epoxidul vitaminei K nu poate fi redus și se acumulează, după care este excretat. Dacă se administrează o vitamina K sub formă chinonică, aceasta poate fi redusă la forma hidrochinonică de către chinon reductaza insensibilă la warfarină, iar carboxilarea poate continua, cu o utilizare stoichiometrică a vitaminei K și cu excretația epoxidului. Astfel, o doză mare de vitamina K reprezintă antidotul la o supradoză de warfarină.

Protrombina și câteva alte proteine din sistemul care controlează coagularea sângelui (factorii VII, IX și X, proteinele C și S) conțin fiecare între patru și șase resturi γ -carboxiglutamat care chelează ionii de calciu permițând astfel legarea proteinelor implicate în coagularea sângelui de membrane. În cazurile de carență în vitamina K sau în prezența warfarinei, este eliberat în circulație un precursor anormal al protrombinei (preprotrombină) care conține prea puține sau care nu conține de loc resturi γ -carboxiglutamat, fiind incapabilă să cheleze ionii de calciu.

Vitamina K este necesară și pentru sinteza proteinelor chelatoare de calciu din oase. Dacă se administrează femeilor gravide warfarină, pot apărea anomalii osoase la feto (sindromul warfarinic fetal). La nivelul oaselor, există două proteine care conțin γ -carboxiglutamat, osteocalcina și proteina matricială osoasă Gla. Osteocalcina conține și hidroxiprolină, astfel încât sinteza ei depinde atât de vitamina K cât și de vitamina C. Mai mult, sinteza ei este indusă de vitamina D, astfel că prezența osteocalcinei în sistemul circulator constituie un indice al existenței și activității vitaminei D în organism.

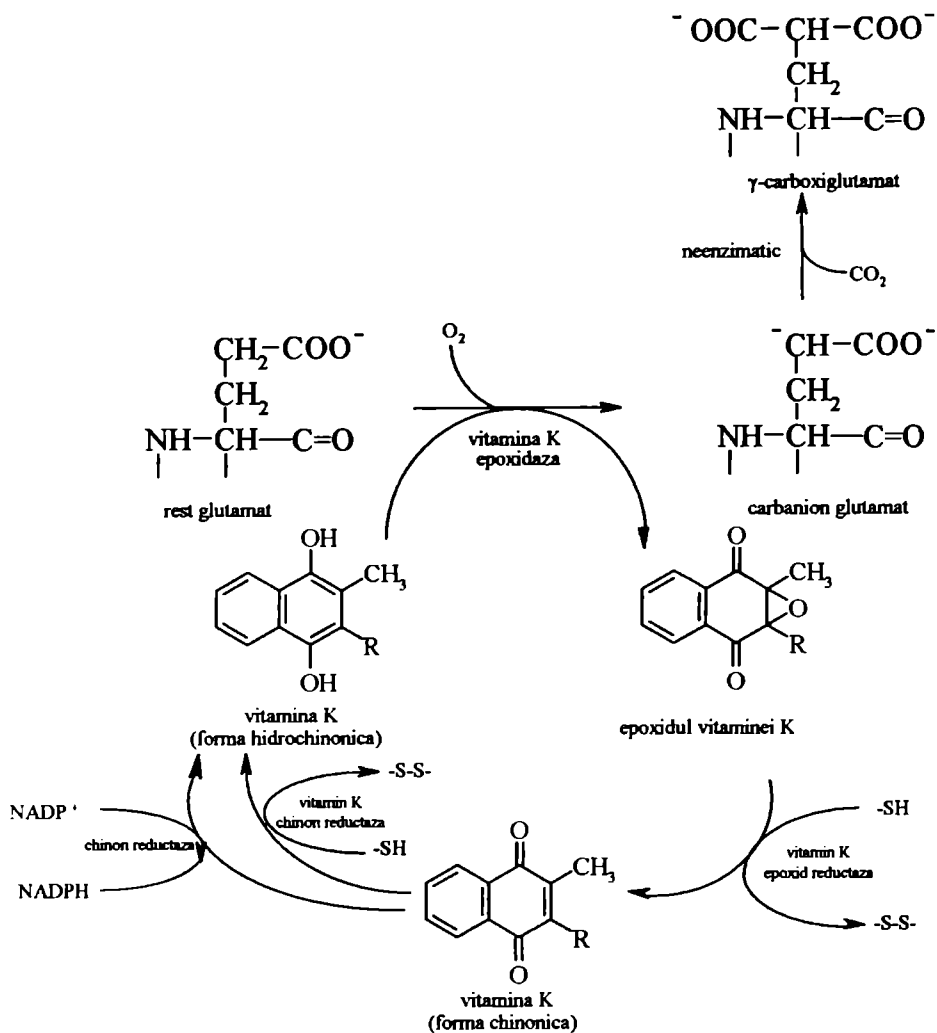
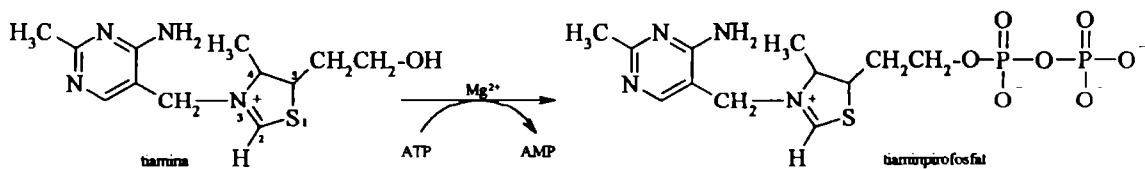


Figura 6.7. Rolul vitaminei K în biosinteza γ -carboxiglutamatului

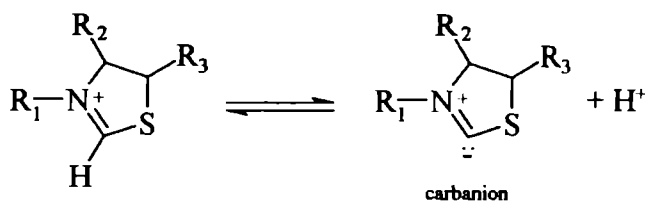
6.3. Vitaminele hidrosolubile

6.3.1. Vitamina B₁ (tiamina)

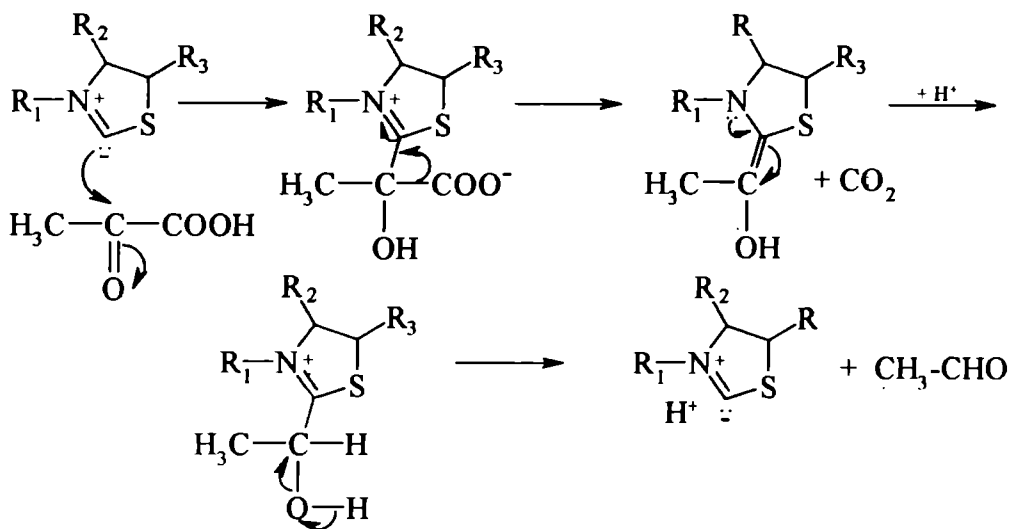
Vitamina B₁ a fost denumită și „aneurină” datorită acțiunii sale antinevritice. Denumirea de „tiamină” este cea mai nouă și cea mai utilizată, deoarece molecula sa conține sulf și o grupare amino. Tiamina se găsește predominant în plante, în special leguminoase, în semințe și drojdii, ficat, rinichi, unt, gălbenuș de ou. Tiamina este alcătuită dintr-un nucleu pirimidinic și un ciclu tiazolic legate printr-o punte metilen. Forma activă a tiaminei o constituie esterul său pirofosforic denumit tiaminpirofosfat (TPP), care se obține prin fosforilarea tiaminei în prezența ATP și a ionilor Mg^{2+} .



Tiamina joacă un rol central în metabolismul energetic, în special în metabolismul carbohidraților. **Tiaminpirofosfatul** este coenzima a trei complexe multienzimatice care catalizează reacții de decarboxilare oxidativă: piruvat dehidrogenaza în metabolismul carbohidraților; α -cetoglutarat dehidrogenaza în ciclul acidului citric; cetoacid dehidrogenaza implicată în metabolizarea aminoacizilor cu catenă ramificată, leucina, izoleucina și valina. Este și coenzimă pentru transcetolaze, fosfocetolaze și α -aminoacidoxidaze. În mecanismul acestor reacții, locul de acțiune este C2 din ciclul tiazolic, unde atomul de hidrogen este ușor dissociabil, datorită heteroatomilor atrăgători de electroni din pozițiile 1 și 3, rezultând un carbanion.



Carbanionul format participă la reacția de decarboxilare a cetoacizilor. De exemplu, acidul piruvic este decarboxilat până la acetaldehidă, după următorul mecanism:



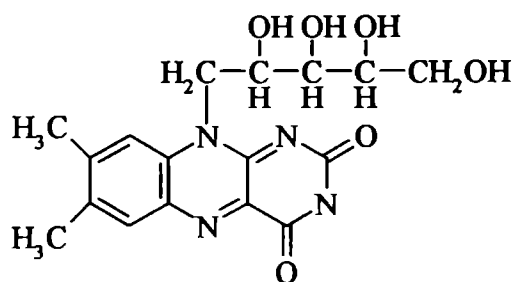
În cazul unui deficit de tiamină, apar trei sindroame distincte:

- 1) Acidoza lactică, în care metabolizarea acidului piruvic nu se mai produce, fapt care determină acumularea acestuia în lichidele și țesuturile organismului, ceea ce antrenează o serie de manifestări patologice, caracteristice bolilor de avitaminoză B₁: crampe musculare, fenomene toxice pentru sistemul nervos, tulburări cardiace, edem, somnolență, oboseală, atonie gastro-intestinală, tulburări de resorbție, pierdere în greutate, etc.
- 2) Nevrită cronică periferică (sindromul beri-beri) care poate fi asociată sau nu cu stop cardiac și edeme.
- 3) Encefalopatia Wernicke cu psihoză Korsakoff, care sunt asociate în special cu consumul mare de alcool sau droguri.

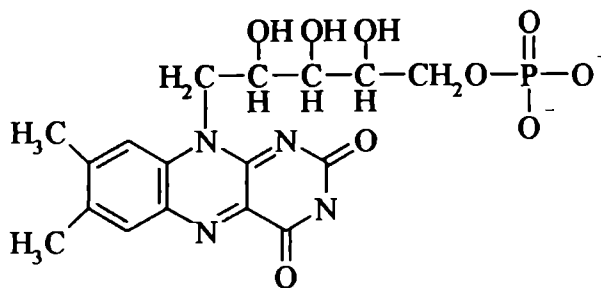
Tiamina intervine și în alte procese biochimice, cum ar fi: stimularea biosintezei lipidelor din glucide, reglarea metabolismului glucidic și a unor procese ergogeneratoare, stimularea activității acetilcolinei (mediator al transmiterii influxului în sistem nervos vegetativ. Stimularea electrică a celulei nervoase duce la o scădere puternică a TPP membranar însoțită de eliminarea tiaminei libere. Această observație a dus la concluzia că TPP acționează pe post de donor de grupări fosfat în procesul de fosforilare a canalului ionic de transportare a sodiului prin membrana neuronului.

6.3.2. Vitamina B₂ (Riboflavina)

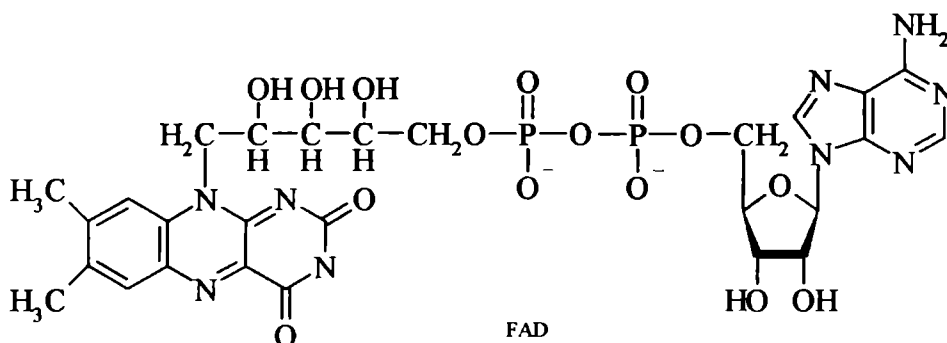
Vitamina B₂ intră în componența a două coenzime: **flavin mononucleotid (FMN)** și **flavin adenin dinucleotid (FAD)**. Vitamina B₂ se mai numește și riboflavină potrivit structurii sale de flavină (pigment galben provenit de la izoaloxazină) atașată de un radical ribitol (derivat de la riboză). Riboflavina în forma sa liberă se găsește în lapte, retină, lichidul seminal. În celule, riboflavina se găsește exclusiv sub formă de FMN sau FAD, combinate cu proteine (flavoproteine sau flavoenzime). FMN se formează în organism prin fosforilarea ATP-dependentă a riboflavinei. FAD este obținut din FMN, prin transferul unui fragment de AMP din ATP. Sursa principală de riboflavină o constituie produsele lactate. Din cauza culorii sale galben-intens, vitamina B₂ este folosită pe scară largă pe post de colorant alimentar.



Riboflavina (vitamina B₂)

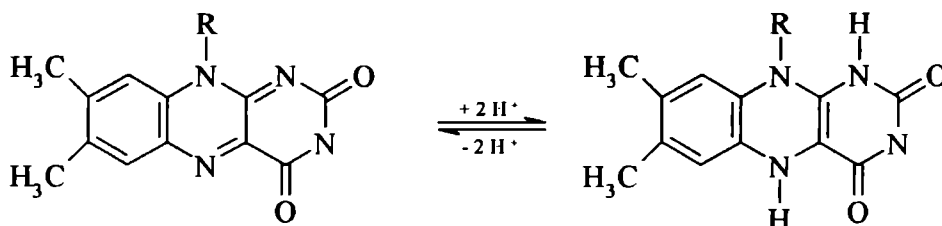


FMN

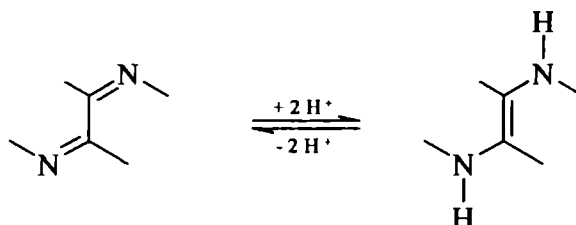


FAD

FMN și FAD funcționează ca transportori de hidrogen în sistemele de oxidoreducere biologică, această activitate datorându-se structurii inelului izoaloxazinic.



sau schematic



Există peste 40 enzime flavinice oxidoreducătoare. Acestea includ enzime din lanțul respirator mitocondrial, enzime-cheie din oxidarea acizilor grași și a aminoacizilor, ciclul acidului citric. Reoxidarea flavinelor reduse din oxigenaze se face sub acțiunea flavinoxidazelor și are loc prin intermediul unor radicali flavinici și flavin hidroperoxizi, cu generare de ioni superoxid, radicali

hidroperoxil și peroxid de hidrogen. Din acest motiv, flavinioxidazele au o contribuție semnificativă la stresul oxidativ din organism. Câteva exemple de enzime flavinice oxidoreducătoare sunt prezentate în Tabelul 6.5.

Rolul riboflavinei se extinde și asupra altor procese biochimice, cum ar fi: biosinteza hemoglobinei, stimularea producerii HCl de către mucoasa gastrică, acționarea în procesul vederii prin transformarea radiațiilor luminoase cu lungime de undă mică în lumină cu lungime de undă mare, pentru care ochiul are o sensibilitate mai mare.

Tabelul 6.5. Câteva enzime flavinice

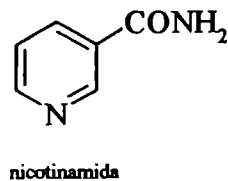
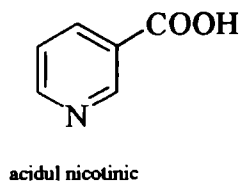
Enzime FMN dependente	Enzime FAD dependente
- citocrom reductaza - L-aminoacid oxidaza - fermentul galben al lui Warburg	- D-aminoacid oxidaza - xantinoxidaza - glucozooxidaza - succinatdehidrogenaza - lipoildehidrogenaza - acil CoA dehidrogenaza

Carența în vitamina B₂ este larg răspândită, dar nu este fatală, datorită faptului că organismul are o capacitate mare de conservare a flavinelor tisulare. Carența se manifestă prin: dermatită seboreică, cheiloză (inflamarea și fisurarea colțurilor gurii), descuamare linguală, glosodimie (sensibilitate dureroasă a limbii), limba magenta (limba devine purpurie și foarte dilatată), oboseală vizuală, vascularizarea accențuată a corneei, etc.

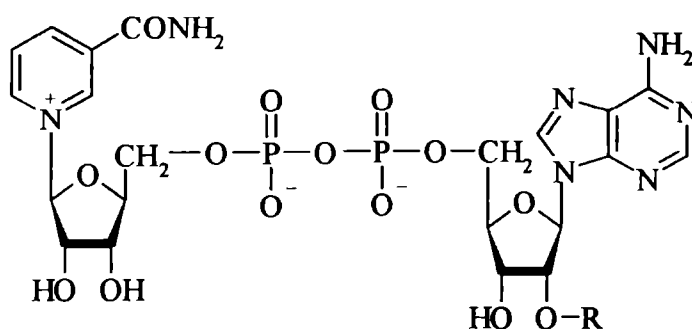
6.3.3. Niacina

Niacina (denumirea generică a două substanțe cu activitate vitaminică: acidul nicotinic și nicotinamida) este vitamina care înlătură simptomele pelagrei. Era denumită și vitamina PP (**pelagro-preventivă**). Pelagra (pella agra – „piele aspră” în limba spaniolă) se întâlnește în rândul populației conumatoare de porumb și este cunoscută sub numele de „maladia celor trei D”: dermatită, diaree, demență.

Nicotinamida nu este în sensul strict o vitamină, deoarece poate fi sintetizată de organism din amonoacidul esențial **triptofan**. Zeina, proteina din porumb, este săracă în triptofan, ceea ce explică prevalența bolii la consumatorii de porumb. Nicotinamida este răspândită în țesuturile vegetale și animale, dar poate fi furnizată organismului și de către flora bacteriană din intestin, care are capacitatea de a o sintetiza pornind de la **ornitină**.

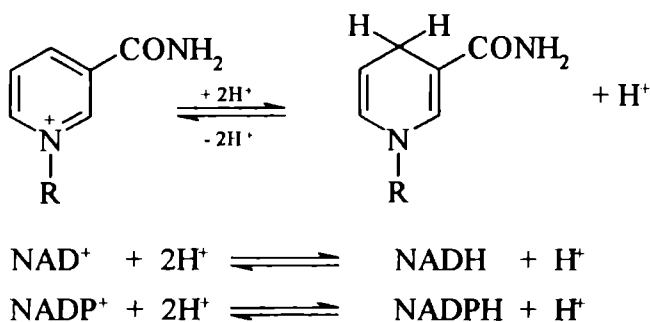


Funcția metabolică a niacinei este efectuată de nucleul nicotinamidic din două coenzime implicate în procese biochimice de oxidoreducere: **nicotin adenin dinucleotid (NAD^+)** și **nicotin adenin dinucleotid fosfat (NADP^+)**:



Structura NAD^+ ($\text{R} = \text{H}$)
și NADP^+ ($\text{R} = -\text{PO}_3\text{H}_2$)

Mecanismul de acțiune al coenzimelor NAD^+ și NADP^+ este următorul:



În general, NADH cedează hidrogen enzimelor din catena de respirație celulară, pe când NADPH cedează hidrogen sistemelor enzimatic implicate în reacțiile de biosinteză. Pe lângă rolul său de

coenzimă, NAD^+ reprezintă și sursa de ADP-riboză în procesele de ADP-ribozilare a proteinelor și de poli-ADP-ribozilare a nucleoproteinelor implicate în mecanismele de reparare a ADN-ului.

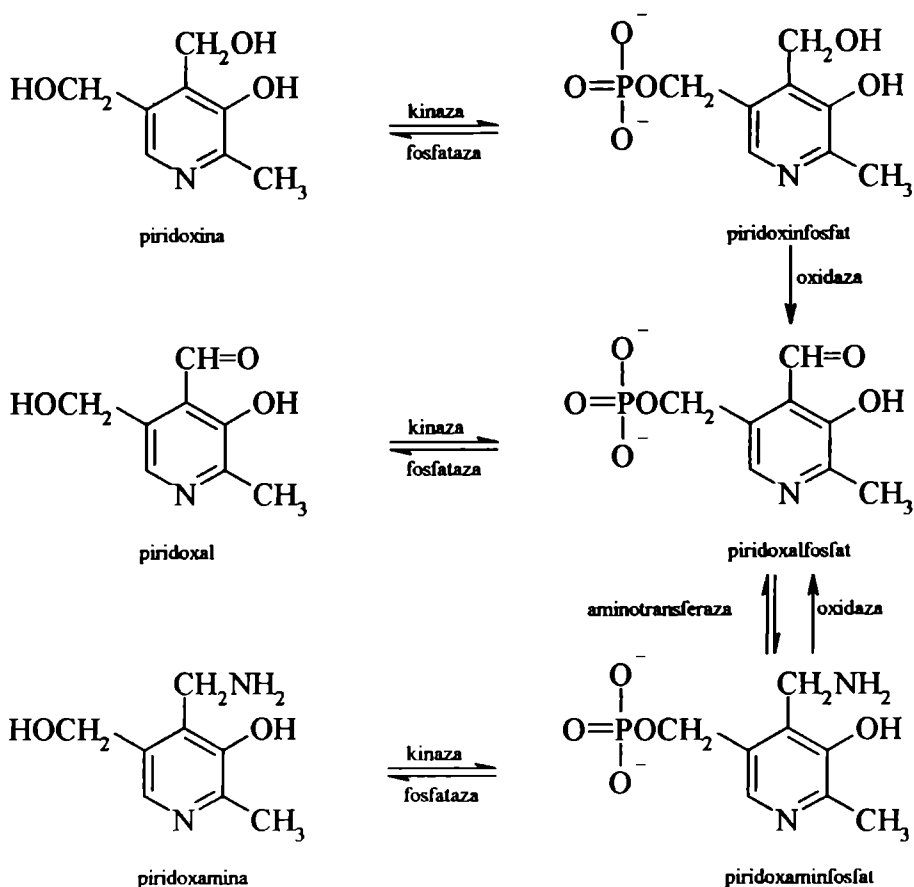
Efectele carenței. Pelagra debutează cu o dermatită fotosensibilă, iar pe măsură ce boala progresează apar demența și posibil diareea, care duc la moarte dacă boala nu este tratată. Deși etiologia pelagrei este acum bine stabilită, iar administrarea de niacină și triptofan o previn și o vindecă, există și alți factori implicați. De exemplu, trebuie luate în considerare eventualele carențe în vitaminele B_2 și B_6 , ambele necesare în biosinteza nicotinamidei din triptofan. Cazurile de pelagră sunt aproximativ de două ori mai numeroase la femei decât la bărbați, probabil datorită inhibării metabolismului triptofanului de către metabolii estrogeni.

Există și o serie de maladii genetice care provoacă perturbări în metabolismul triptofanului și care sunt asociate cu apariția pelagrei, în ciuda unei alimentații cu un conținut adecvat de niacină și triptofan. **Boala Hartnup** de exemplu este o maladie genetică rară caracterizată prin existența unui defect în transportul triptofanului prin membrana celulară. Acest lucru provoacă scăderi masive a concentrației de triptofan din organism din cauza malabsorbției intestinale și blocării reabsorbției renale. În **sindromul carcinoid**, se întâlnesc metastaze ale tumorilor primare ale celulelor enterocromafine, care sintetizează 5-hidroxitriptamina. Prin producerea în exces a 5-hidroxitriptaminei se utilizează peste 60% din triptofanul din organism, putând duce la apariția pelagrei. Pelagra se datorează și incapacității organismului de a transforma triptofanul în nicotinamidă în cazuri de alcoolism cronic, ciroză hepatică, etc. De menționat și faptul că porumbul conține analogi structurali ai triptofanului care acționează ca inhibitori competitivi, blocând conversia triptofanului în nicotinamidă.

Efectele hipervitaminozei. Acidul nicotinic a fost utilizat o perioadă în tratamentul hiperlipidemiei, având ca efecte secundare dilatarea vaselor sangvine, bufeuri, iritații ale pielii. Ingerarea acidului nicotinic sau a nicotinamidei în exces poate provoca leziuni hepatice. **Surse naturale:** drojdia de bere, grâu, cartofi, orez nedecorticat, ficat, inimă, rinichi, mușchi de vită, etc.

6.3.4. Vitamina B_6

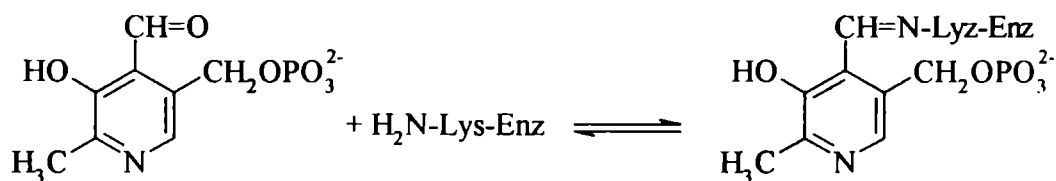
Există șase compuși cu activitate de vitamina B_6 : **piridoxina, piridoxalul, piridoxamina și 5'-fosfoderivații lor.** Coenzima activă este 5'-piridoxal fosfatul, în care sunt convertite celelalte două forme. Aproximativ 80% din totalul de vitamină B_6 din organism se găsește concentrat în mușchi, în special asociat cu enzima glicogenfosforilaza.



Structura vitamerilor interconvertibili ai vitaminei B₆.

Piridoxalfosfatul îndeplinește rolul de coenzimă pentru o serie de transformări ale aminoacizilor: transaminarea, decarboxilarea, dezaminarea, racemizarea. În calitate de coenzimă participă și la alte reacții specifice ale unor aminoacizi: interconversia serinei și glicinei, sinteza triptofanului, transformarea triptofanului în acid nicotinic, transsulfurarea.

S-a demonstrat că în toate enzimele care implică participarea piridoxalfosfatului drept coenzimă, aceasta se leagă printr-o legătură covalentă labilă de gruparea amino a unei lizine din structura enzimei respective.



Piridoxalfosfatul este cofactor și pentru glicogen fosforilază; în acest caz, gruparea fosfat are importanță catalitică.

Efectele carenței. Deși avitaminozele sunt rare, o parte importantă a populației suferă de carențe moderate în vitamina B₆, cu apariția unor anomalii în biosinteza metioninei și triptofanului. Carența mai anansată produce dermatite, anemii severe, uneori convulsii asociate cu tulburări profunde ale sistemului nervos central, diminuarea ritmului de creștere, scăderea nivelului hemoglobinei și colesterolului seric, creșterea în greutate a unor organe (ficat, rinichi, suprarenale).

Vitamina B₆ are un rol important în acțiunea hormonilor steroizi, participând în faza terminală a acțiunii acestora la eliberarea complexului hormon-receptor din interacția cu ADN-ul. Astfel, în cazurile de carență se manifestă o sensibilitate crescută la acțiunea chiar a unei cantități foarte mici de estrogeni, androgeni, cortizol și vitamina D. Această sensibilitate la acțiunea hormonilor steroizi poate avea importanță în apariția și evoluția cancerelor hormon-dependente ale sânelui, uterului sau prostatei.

Efectele hipervitaminozei. La pacienții care sunt tratați cu doze mari de vitamina B₆ s-au observat cazuri de neuropatie senzorială și de modificări neurologice, cu leziuni care persistă chiar și după scăderea considerabilă a dozei.

6.3.5. Vitamina B₁₂

Vitamina B₁₂ reprezintă un grup de compuși biologic activi denumiți **cobalamine** sau **corinoide** (compuși cu cobalt, care conțin ciclul corinic). Utilizarea vitaminei B₁₂ a fost posibilă după ce s-a observat că unele microorganisme ca *Streptomyces griseus* sintetizează și eliberează în mediul de cultură cantități importante de vitamina B₁₂ (vitamina B₁₂ este un produs secundar al fabricării streptomicinei). Este sintetizată exclusiv de microorganisme, și se găsește numai în alimentele de origine animală. Există și unele corinoide care sunt factori de creștere pentru anumite microorganisme, dar nu au activitate de vitamina B₁₂; ele pot acționa ca anti-metaboliți ai vitaminei. Neexistând surse vegetale pentru această vitamină, vegetarianii sunt supuși riscului de a suferi de carențe în această vitamină.

Vitamina B₁₂ are în structura sa următoarele fragmente:

- 1) Un macrociclu derivat de la porfirină (**corina**) format din patru nuclee pirolice (A, B, C, D) cu șase legături conjugate, într-o aranjare diferită de aceea din nucleul porfirinic: trei punți metinice de legătură la trei nuclee pirolice.
- 2) Un nucleotid format din 5, 6-dimetilbenzimidazol, ribofuranoză și acid fosforic (rest **ribazol**).
- 3) Un rest de aminopropanol, care face legătura dintre nucleul corinic și restul ribazol.

- 4) Un atom de Co (III) situat în centrul nucleului tetrapirolic fixat prin legături coordinative de atomii ciclurilor pirolice și legat în același timp de azotul N3 din ciclul imidazolic al 5,6-dimetilbenzimidazolului.

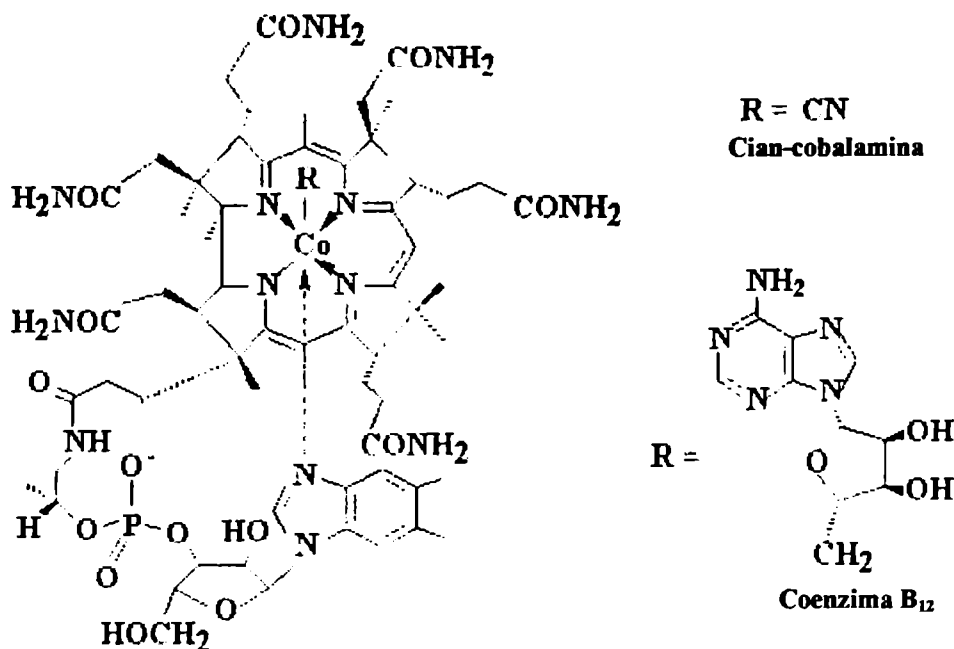
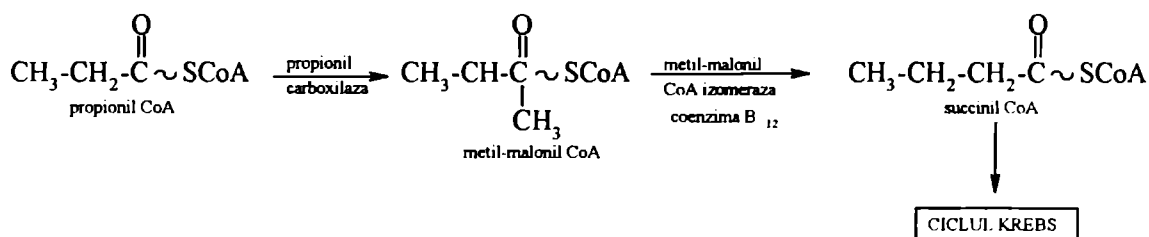


Figura 6.8. Vitamina B₁₂ (cobalamina). R poate fi variat, pentru a se obține diferite forme ale vitaminei. R = CN⁺, ciancobalamina; R = OH⁺, hidroxicobalamina; R = 5'-deoxiadenozil, 5'-deoxiadenozilcobalamina; R = H₂O, acvacobalamina; R = CH₃, metilcobalamina

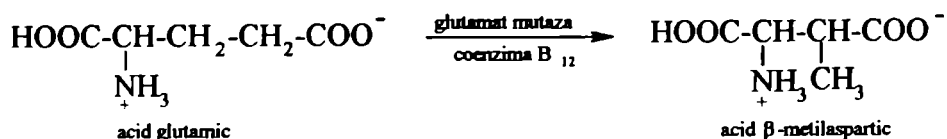
În organismul uman, vitamina B₁₂ se găsește predominant sub formă de coenzimă, numită **coenzima B₁₂**. Aceasta rezultă prin conversia cobalaminei prin înlocuirea grupării-CN cu gruparea 5'-adenozil sub acțiunea coenzim-B₁₂ sintetazei. Coenzima B₁₂ intervine într-o serie de procese:

- 1) Izomerizarea metilmalonatului, care se formează ca intermediar în catabolismul valinei sau în catabolismul propionaților, unde propionil CoA apare ca rezultat al catabolismului izoleucinei, colesterolului și mai rar, a acizilor grași cu număr impar de atomi de carbon.

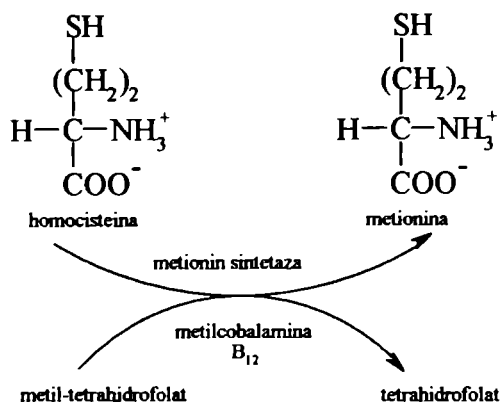


Activitatea metilmalonil CoA izomerazei este mult redusă în cazurile de carență de vitamina B₁₂, când se acumulează metilmalonil CoA. Prezența metilmalonatului în urină este un indice al carenței de vitamina B₁₂.

2) Transformarea acidului glutamic în acid β-metilaspartic sub acțiunea glutamatmutazei.



3) Metilarea homocisteinei cu formarea metioninei.



Carența în vitamina B₁₂ duce la acumularea homocisteinei, apariția homocisteinuriei și blocarea folatului sub formă de metiltetrahidrofolat.

Vitamina B₁₂ (factorul extrinsec) este absorbită numai legată de **factorul intrinsec**, o glicoproteină mică secretată de celulele parietale din mucoasa gastrică. Acidul gastric și pepsina eliberează vitamina din alimentate, făcând-o disponibilă pentru legarea de **cobalofilină**, o proteină care este secretată în salivă. Cobalofilina este hidrolizată la nivelul duodenului, eliberându-se vitamina B₁₂ pentru a fi legată de factorul intrinsec. În **insuficiența pancreatică** cobalofilina nu este hidrolizată, complexului vitamina B₁₂-cobalofilină este excretat și rezultă fenomene carențiale de vitamina B₁₂. Factorul intrinsec poate lega vitamerii B₁₂, dar nu și alți corinoizi. Vitamina B₁₂ este absorbită în ileum (parte a intestinului subțire) prin receptori care leagă complexul vitamina B₁₂-factor intrinsec, dar nu și vitamina B₁₂ sau factorul intrinsec separat.

Vitamina B₁₂ prezintă un spectru larg de acțiune intervenind în reacțiile de metilare, carboxilare și biosinteza ADN-ului, biosinteza hemului, biosinteza proteinelor, ca și stimularea anabolismului proteic și lipidic. Sub aspect fiziologic manifestă un rol esențial în procesul de **hematopoieză**, prevenind anemia; constituie un factor de creștere pentru organismele tinere și favorizează diviziunea celulară .

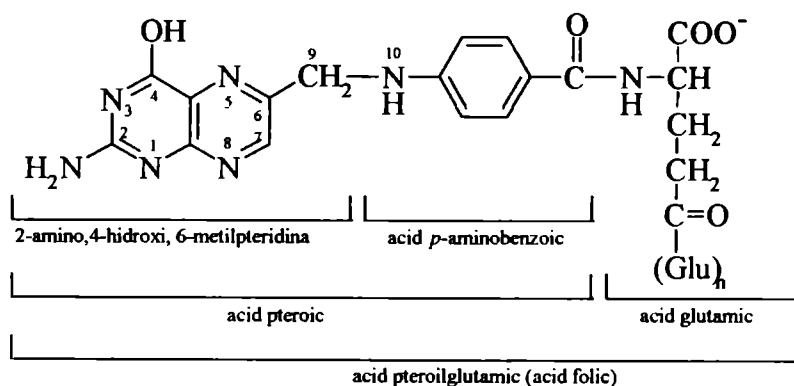
Carența în vitamina B₁₂

Carența în vitamina B₁₂ provoacă **anemia pernicioasă**; metabolismul acidului folic este blocat, proeritroblaștii măduvei osoase nu se mai pot maturiza în normoblaști, ci dau naștere unor celule imature deformate de tip megaloblastic (anemia megaloblastică). Cauza anemiei pernicioase este de cele mai multe ori cauzată de imposibilitatea mucoasei gastrice de a secreta factorul intrinsec fie datorită unor boli autoimune ale celulelor parietale, fie apariției unor anticorpi anti-factor intrinsec. Alături de tulburările hematologice (caracteristice) se înregistrează și alte simptome: astenie, paloare, atrofia mucoaselor digestive, afecțiuni neurologice, etc. Administrarea acidului folic concomitent cu vitamina B₁₂ („factorul antipernicios”) face ca toate aceste fenomene să dispară.

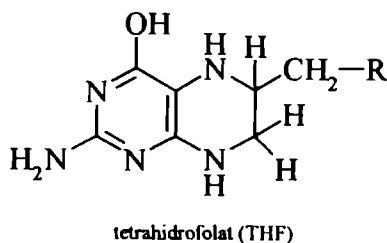
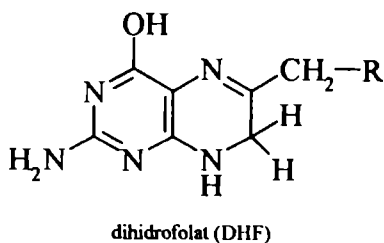
Surse bogate în vitamina B₁₂: ficat, splină, gălbenuș, rinichi, stridii, heringi.

6.3.6. Acizii folici

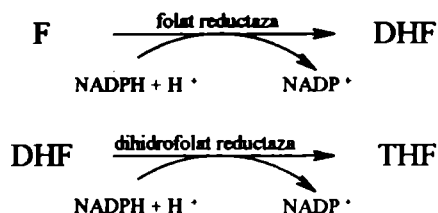
Acidul folic a fost izolat din spanac și din plantele verzi, care au capacitatea de a-l sintetiza. În organismul animal, țesutul cel mai bogat în acid folic este ficatul. Acidul folic conține trei fragmente constitutive: a) pteridină substituită; b) acid para-aminobenzoic; c) acid glutamic.



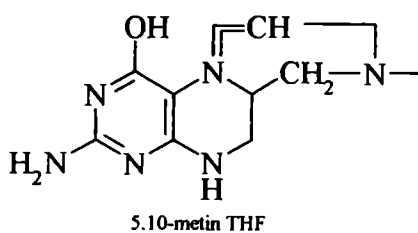
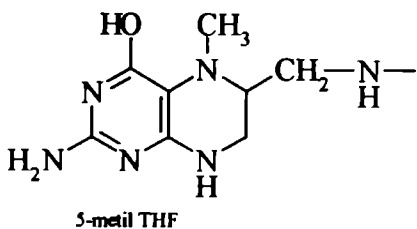
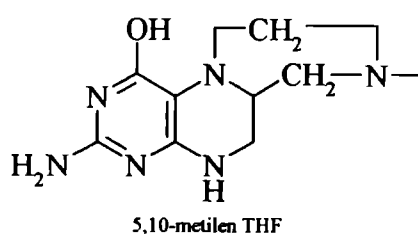
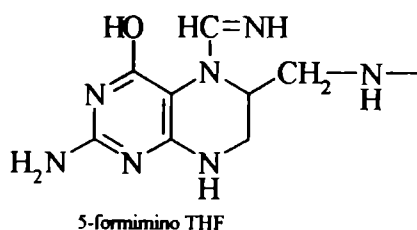
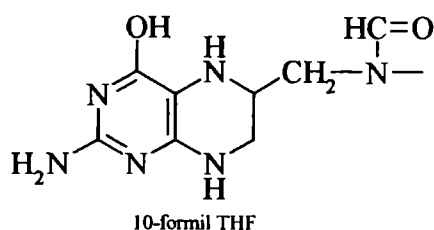
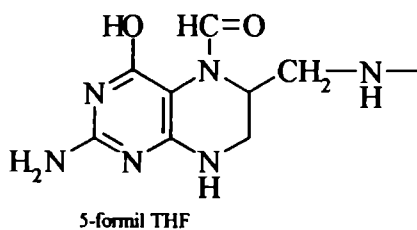
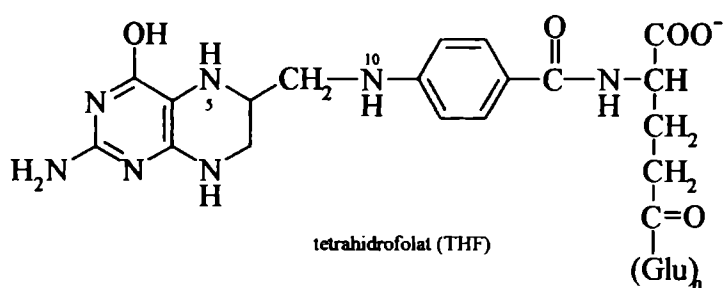
În țesuturile vii, acidul pteroilmonoglutamic este însoțit de derivații săi acidul pteroiltriglutamic și acidul pteroilheptaglutaric. Sub acțiunea unor enzime denumite conjugaze, acești derivați se transformă în acid pteroilpentaglutaric. Acidul folic este redus în celule la dihidrofolat (DHF) sub acțiunea **folat reductazei**. Într-o altă etapă intervine **dihidrofolat reductaza**, care reduce DHF la tetrahidrofolat (THF).



Coenzima în cazul ambelor reductaze este NADPH.



Forma activă a acidului folic (pteroil-glutamatul) este tetrahidrofolatul. Folații din alimente pot avea până la șapte resturi de glutamat unite prin legături γ -peptidice. Toți folații substituiți prezentați mai jos pot fi prezenți în alimente.



Tetrahidrofolatul este transportor de fragmente cu un atom de carbon, care se pot atașa la N-5 (grupări formil, formimino sau metil), la N-10 (grupări formil) sau la N-5,N-10 (punți metilen sau metin). 5-Formil-tetrahidrofolatul este mai stabil și este utilizat ca agent farmaceutic, cunoscut sub denumirea de **acid folinic**. Compusul sintetic (racemic) este cunoscut sub denumirea de **leucovorină**.

Metilen-tetrahidrofolatul este „poarta de intrare” pentru fragmentele cu un atom de C, fiind derivatul care se obține inițial din reacția glicinei, serinei și colinei cu THF. Serina este cea mai importantă sursă de tetrahidrofolati substituiți utilizați în reacțiile biosintetice, activitatea serin-hidroxiometiltransferazei fiind reglată de proporția de substituie a tetrahidrofolatului precum și de concentrația tetrahidrofolatului liber. Reacția este reversibilă, în ficat putându-se forma serină din glicină.

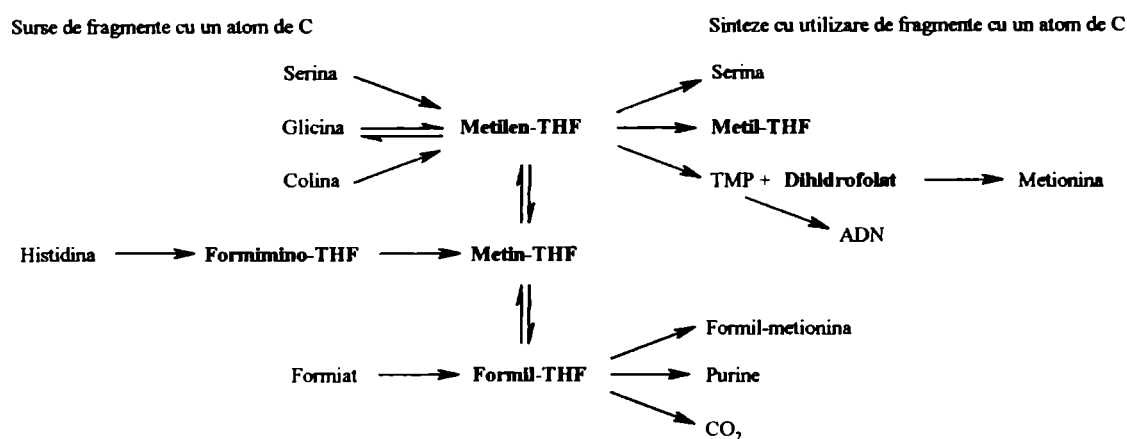


Figura 6.9. Proveniența și utilizarea derivaților tetrahidrofolicilor.

Metilen-, metin- și 10-formil-tetrahidrofolatii sunt interconvertibili. Când organismul nu mai are nevoie de derivații tetrahidrofolicilor, are loc oxidarea formil-tetrahidrofolatului la CO₂ și THF liber.

THF intervine într-o serie de procese, cum ar fi: biosinteza bazelor purinice și pirimidinice, conversia uracilului în timină (formarea ADN-ului), sinteza N-formil metioninei (implicată în inițierea biosintezei proteinelor), interconversia metionină-colină (participând astfel în metabolismul aminoacizilor și a fosfatului), transformarea glicinei în serină, biosinteza hemului și a histidinei, etc.

Metilarea deoxiuridin monofosfatului (dUMP) la timidin monofosfat (TMP) este catalizată de timidilat sintază și reprezintă o etapă esențială în sinteza ADN-ului. Donorul de grupări metil este metilen-THF, care este disproporționat la gruparea metil și dihidrofolatul liber. Dihidrofolatul este apoi reconvertit în THF de către **dihidrofolat reductază**. Timidilat sintaza și dihidrofolat reductaza sunt

două enzime foarte active în țesuturile cu o rată mare de diviziune celulară. **Metotrexatul** (acidul 4-amino,10-metilfolic), un analog al 10-metil-THF utilizat ca medicament anti-canceros, este un inhibitor al dihidrofolat reductazei. Dihidrofolat reductazele din unele bacterii sau paraziți sunt diferite de enzima umană; anumiți inhibitori ai acestor enzime pot folosiți ca agenți antibacterieni (trimetoprim) sau antimalarici (pirimetamina).

Efectele carenței. Dintre simptomele carenței de acizi folici, cele mai caracteristice sunt cele de anemie gravă, de tip megaloblastic, macrocitar și hipercrom. Aceasta înseamnă că în sângele circulant se găsesc forme primitive de globule roșii, cu dimensiuni mari și foarte bogate în hemoglobină, care apar în anemia pernicioasă, cauzată de carența vitaminei B₁₂.

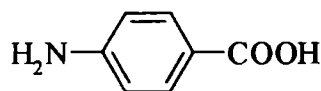
Sinteza metioninei din homocisteină este catalizată de metionin sintază, o enzimă dependentă de vitamina B₁₂. Gruparea metil în acest proces este donată de metil-THF, cu formarea THF. Reducerea metilen-THF la metil-THF este ireversibilă, sursa principală de THF pentru țesuturi fiind metil-THF. Metionin sintaza este o verigă de legătură între metabolismul acizilor tetrahidrofolici și vitamina B₁₂. Carența în vitamina B₁₂ perturbă activitatea metionin sintazei ducând la acumularea metil-THF („capcană pentru metil-THF”). Prin urmare, carența de vitamina B₁₂ conduce la apariția unei carențe funcționale de THF (carență secundară). Atât carența primară de acizi folici cât și carența secundară, indusă de carența de vitamină B₁₂, afectează celulele cu o rată mare de diviziune, deoarece aceste celule au necesități crescute de timidină pentru sinteza ADN-ului. Din punct de vedere clinic, acest lucru afectează măduva osoasă, ducând la instalarea anemiei megaloblastice.

Inactivarea enzimei metilen-THF reductaza (genetică sau indusă) care catalizează transformarea metilen-THF în metil-THF induce carență de THF și blochează sinteza metioninei de către metionin sintază. Rezultă o creștere a nivelului de homocisteină din sânge, un factor de risc în ateroscleroză, tromboză și hipertensiune. Pacienții cu forme anormale de metilen-THF reductază nu prezintă hiperhomocisteinemie dacă li se administrează doze relativ ridicate de THF.

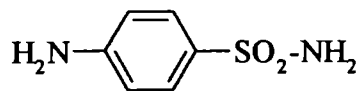
Efectele hipervitaminozei. Anemia megaloblastică provocată de carența în vitamina B₁₂ poate fi tratată cu doze mari de acizi folici, dar acestea pot grăbi dezvoltarea ireversibilă a leziunilor nervoase observate în cazul carenței de vitamina B₁₂. S-au observat și efecte antagonice între acizii folici și unele anticonvulsive utilizate în tratamentul epilepsiei.

6.3.7. Acidul *para*-aminobenzoic

Acidul *para*-aminobenzoic (PAB) a fost considerat vitamină din momentul în care s-a constatat acțiunea sa antagonistă față de sulfamide.



acid *p*-aminobenzoic



p-aminobenzenesulfonamida

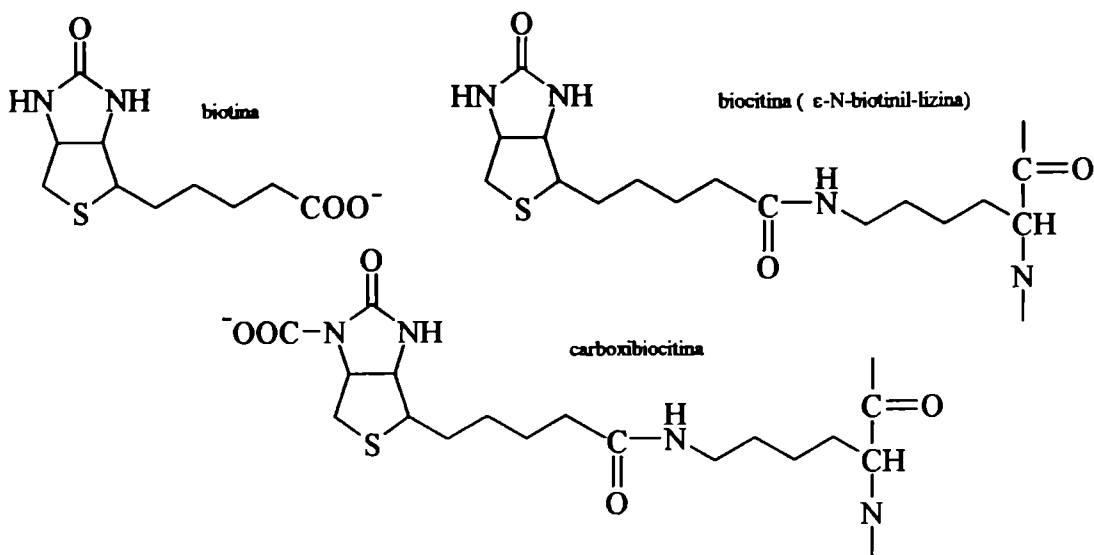
Este răspândit în plante, țesuturi animale și microorganisme, sub formă liberă sau combinată, fiind constituent al acizilor pteroilglutamici (acizii folici).

PAB participă la formarea acizilor folici intervenind în procesul de creștere, stimulează biosinteza acidului pantotenic și a biotinei, intervine în metabolismul fierului, favorizând transportul acestuia la organele hematopoietice. Interacționează cu sulfonamidele administrate, în raport cu care manifestă o acțiune antagonistă.

Sulfonamidele (sulfamidele) prezintă analogie structurală cu PAB și se comportă ca antivitamine. Ele au un efect bacteriostatic, inhibând creșterea bacteriilor. Mecanismul prin care se realizează acest efect se bazează pe proprietatea sulfonamidelor de a substitui PAB în structura acizilor folici; acești acizi cu structură modificată nu își mai pot exercita acțiunea de stimulare a creșterii bacteriilor. Proprietatea sulfonamidelor de a se comportă ca inhibitori necompetitivi în biosinteza acizilor folici stă la baza utilizării lor în combaterea unor boli infecțioase.

6.3.8. Biotina

Biotina este larg răspândită în microorganisme, drojdii, organisme animale și vegetale. Surse bogate în biotină sunt ficatul și rinichiul mamiferelor, gălbenușul de ou, laptele, fructele și legumele proaspete. Biotina se găsește în organism sub formă liberă și mai ales sub formă de **biocitină** (ε-N-biotinillizină). În sângele uman există o enzimă biotinolaza, care hidrolizează biocitina la biotină și lizină. Forma metabolic activă este **carboxibiotina**.



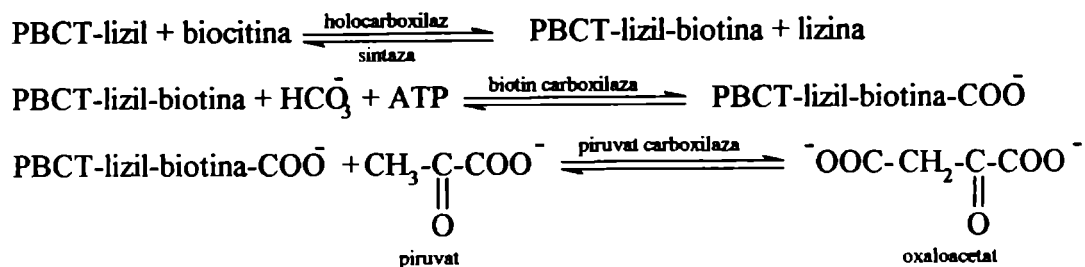
Biotina este sintetizată în exces de flora intestinală, astfel încât boli carentiale sunt practic necunoscute. Carența poate fi indusă la persoanele care sunt hrănite timp de mai multe luni exclusiv pe cale parenterală sau la persoanele care consumă cantități mari de albuș crud. Albușul crud conține o proteină numită **avidină**, cu afinitate mare pentru biotină, care nu mai poate fi absorbită.

Biotina îndeplinește rolul de coenzimă, participând în reacțiile enzimatice de transfer de CO_2 în reacții de carboxilare și decarboxilare a cetoacizilor. Mecanismul de reacție implică participarea unei apoenzime, denumită **proteină biotin-carboxil transportoare (PBCT)**, care leagă covalent o moleculă de biotină prin intermediul lizinei, într-o reacție catalizată de o holocarboxilaz-sintază. În prezența enzimei **biotin carboxilaza**, biotinil-PBCT este carboxilată prin fixarea HCO_3^- , formând un complex intermediar 1-N-carboxi-biotinil-proteină într-o reacție dependentă de ATP. Gruparea carboxil este ulterior transferată la molecula-substrat supusă carboxilării. În Tabelul 6.6 sunt prezentate câteva procese în care biotina participă în calitate de coenzimă.

Tabelul 6.6. Enzime biotin-dependente

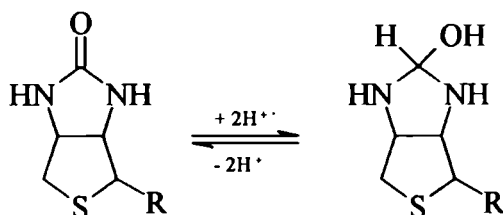
Enzima (PBCT)	Reacția catalizată
acetyl-CoA carboxilaza	acetyl~CoA + $\text{CO}_2 \leftrightarrow$ malonil~CoA
propionil-CoA carboxilaza	propionil~CoA + $\text{CO}_2 \leftrightarrow$ metilmalonil~CoA
piruvat carboxilaza	piruvat + $\text{CO}_2 \leftrightarrow$ oxaloacetat
metilmalonil-CoA carboxilaza	metilmalonil~CoA + piruvat $\leftrightarrow$ propionil~CoA + oxaloacetat

Modul cum intervine o enzimă biotin-dependentă este prezentat în exemplul de mai jos care ilustrează carboxilarea acidului piruvic (etapă cheie în gluconeogeneză).



În toate sistemele enzimatic de carboxilare, biotina în stare potențial funcțională se află numai sub formă de complex proteic analog cu PBCT; sub această formă biotina își manifestă capacitatea de a fixa reversibil CO_2 necesar reacțiilor de carboxilare sau transcarboxilare. Biotina este implicată în procese de o importanță deosebită: biosinteza acizilor grași și a colesterolului, biosinteza și interconversia unor aminoacizi, biosinteza bazelor purinice și pirimidinice, biosinteza proteinelor tisulare și enzimatic, etc.

Biotina mai poate funcționa și ca transportor neenzimatic de hidrogen, conform reacției de mai jos.



Carența biotinică este rară, deoarece flora intestinală sintetizează biotină în cantități corespunzătoare. Când carența este indusă (de exemplu la persoanele sau animalele care se hrănesc timp îndelungat cu ouă crude) apar simptome carențiale care se manifestă prin: dermatite ale extremităților, paloare, somnolență, oboseală, dermatită seboreică însoțită de astenie, dureri musculare, etc. Toate aceste tulburări sunt suprimate prin administrarea parenterală de biotină.

6.3.9. Acidul pantotenic

Acidul pantotenic este un compus universal răspândit, din care cauză simptomele carențiale apar destul de rar. Acidul pantotenic se găsește ca atare sau sub forma sa activă, coenzima A, în organele cu metabolism intens (ficat, rinichi, icrele și lapții de pește) precum și în unele produse în care se concentrează compuși biologic activi, cum ar fi lăptișorul de matcă, cortexul cerealelor, etc. În organismul uman este sintetizat și de flora microbiană intestinală.

Acidul pantotenic joacă un rol central în metabolismul grupărilor acil, intrând în alcătuirea fragmentului panteteinic al coenzimei A (CoASH) și a proteinei transportoare de grupări acil (ACP).

Fragmentul panteteinic rezultă prin condensarea pantotenatului cu cisteina, aceasta din urmă furnizând gruparea prostetică $-SH$ în structura CoA și ACP. CoA prin gruparea sa tiolică poate stabili legături macroergice cu majoritatea acizilor grași întâlniți în celule, pe care îi transportă în vederea oxidării enzimaticе, ia parte la reacții din ciclul acidului citric, sinteza acizilor grași, reacții de acetilare, sinteza colesterolului. ACP participă la sinteza acizilor grași.

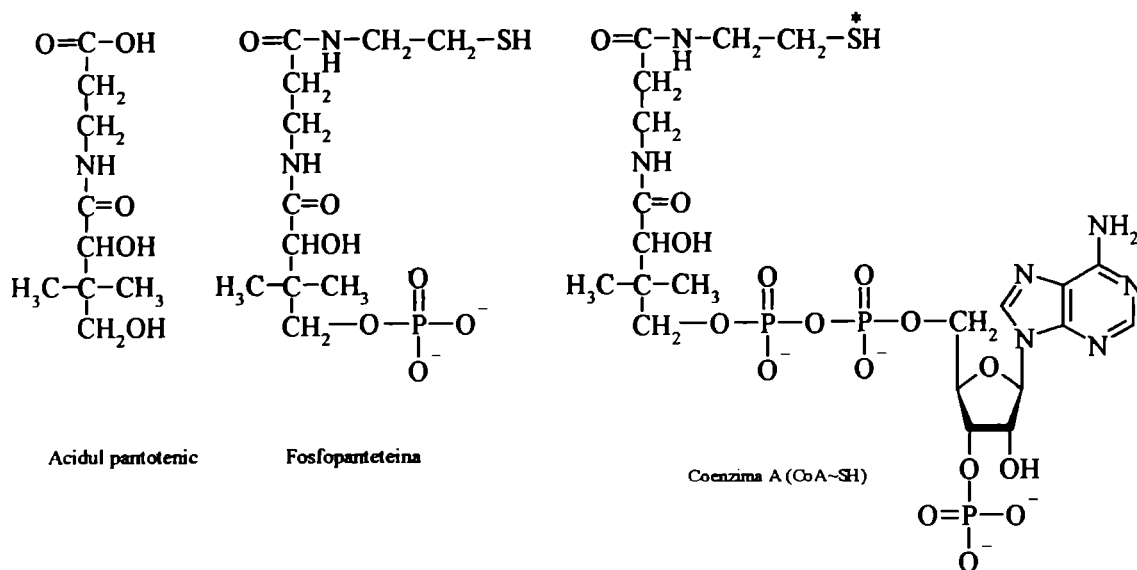


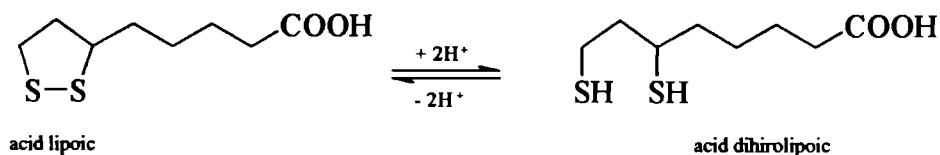
Figura 6.10. Acidul pantotenic și Coenzima A (CoA~SH). Asteriscul reprezintă situsul de acilare de către acizii grași, iar ~ desemnează o legătură macroergică.

În biosinteza acizilor grași intervine și ACP, care participă în procesul de transport al acizilor grași prin membrana mitocondrială, gruparea sa prostetică este fosfopanteteina (gruparea OH primar din acidul pantotenic este esterificată cu acid fosforic). Prin gruparea tiol, molecula ACP~SH funcționează ca un transportor de grupări acil formând tioesteri la gruparea tiol, în mod analog cu CoA.

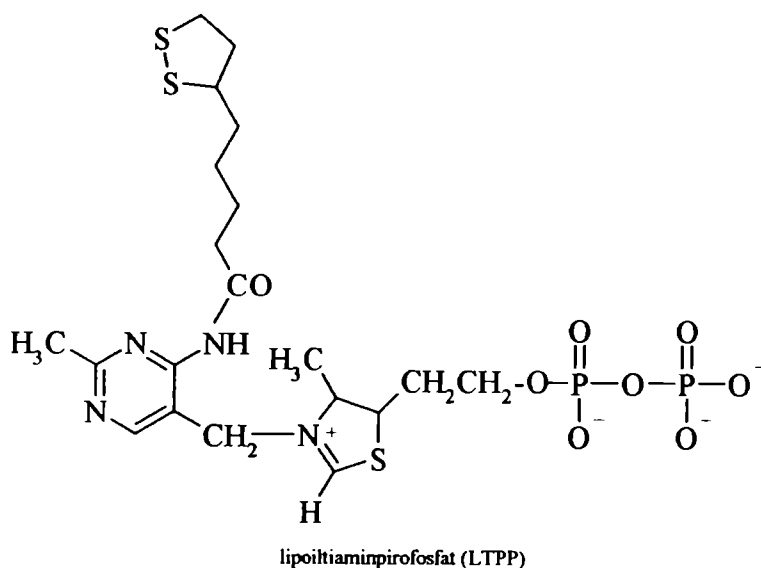
La om nu se cunoaște un sindrom determinat de carența acestei vitamine, deoarece este foarte răspândită în natură. Când din diverse cauze această carență este indusă, simptomele carenței sunt variate și multiple: vărsături, dureri abdominale, crampe musculare, infecții ale căilor respiratorii, sensibilitatea organismului la infecții. Datorită acestui ultim efect se pot produce și alte tulburări: hipoglicemie, reducerea capacității fizice, disfuncții ale nervilor motori, etc.

6.3.10. Acidul lipoic

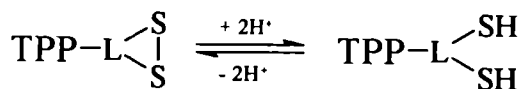
Acidul lipoic sau **acidul tioctic** reprezintă o substanță careia i se atribuie caracter de vitamină, deoarece în anumite procese enzimatice esențiale pentru metabolismul intermediar joacă rol de coenzimă. Acidul lipoic se află răspândit în diferite țesuturi: ficatul și drojdia reprezintă surse bogate în această vitamină. Are o structură relativ simplă (acid 1,2-ditiolan valerianic). În țesuturi se găsește atât sub formă oxidată cât și redusă (**acid dihidrolipoic**).



Forma biologic activă, cu funcție de coenzimă, este lipoiltiaminpirofosfatul (LTPP), produsul de conjugare al acidului lipoic cu esterul pirofosforic al tiaminei.



LTPP funcționează ca un sistem oxido-reducător reversibil.



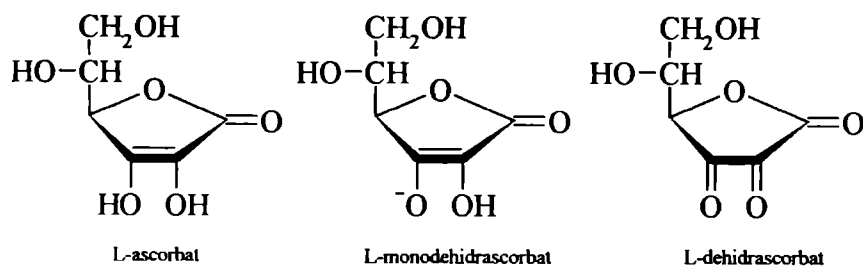
Principala funcție a acidului lipoic o constituie participarea sa în reacția de decarboxilare oxidativă a α -cetoacizilor (acidul piruvic și acidul α -cetoglutaric), sub acțiunea complexelor enzimatiche piruvat dehidrogenaza și respectiv α -cetoglutarat dehidrogenaza. În afecțiunile hepatice care se manifestă cu o dereglare a metabolismului cetoacizilor, se administrează acid lipoic.

6.3.11. Vitamina C

Boala determinată de lipsa **vitaminei C (acidul ascorbic)** se numește **scorbut** și se întâlnește la om, primate, cobai, liliaci și majoritatea peștilor; restul viețuitoarelor sunt capabile să o sintetizeze pe calea acidului uronic din metabolismul glucozei. În organismele care nu o pot sintetiza această cale este blocată datorită lipsei unei enzime, gulonolactonoxidaza, care intervine în ultima etapă a sintezei acidului ascorbic.

Acidul ascorbic este lactona acidului 2,3-endiol-L-gulonic. Biosinteza acidului ascorbic la plante are drept precursori monozaharide din seria D; la animale biosinteza constituie o deviație a ciclului acizilor uronici.

Caracterul acid al vitaminei C este conferit de existența în moleculă a a grupării endiol, care disociază cu punere în libertate de H^+ , acidul **L-ascorbic** transformându-se în forma sa oxidată, acidul **L-dehidroascorbic**.



Atât acidul ascorbic cât și acidul dehidroascorbic au activitate de vitamina C.

Participarea acidului ascorbic în diferite procese biochimice este determinată și corelată cu capacitatea sa de a forma un sistem reversibil de oxidoreducere. Astfel, acidul ascorbic intervine ca transportor de hidrogen în reacțiile catalizate de oxidoreductaze (dehidrogenaze, catalaze, peroxidaze, citocromoxidaze).

căderea dinților, alterări în procesul de formare a oaselor și dinților, care capătă un aspect spongios, scăderea rezistenței la efort și infecții. În stadiu avansat survin: febră, cangrene, hemoragii viscerale, necroze osoase, și uneori complicații pulmonare (pleurezii, pneumonii, tuberculoză, etc.).

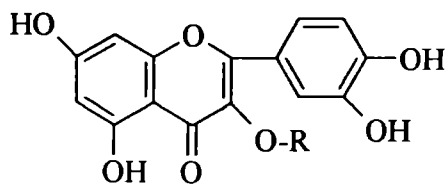
Efectele supradozei. În doze mari, când capacitatea organismului de a metaboliza vitamina C este saturată, vitamina este excretată prin urină. S-a constatat totuși că o supradoză de vitamina C este benefică organismului, deoarece potențează absorbția fierului, care depinde de prezența vitaminei C în tubul digestiv. Contrar convingerilor, nu există date care să ateste faptul că vitamina C previne răceala sau îi diminuează durata și efectele.

Surse bogate în vitamina C. Acidul ascorbic are o largă răspândire în regnul vegetal, în bacterii și mucegaiuri. Alimente bogate în vitamina C sunt: măceșe, afine, citrice, ardei, conopidă, varză, pătrunjel.

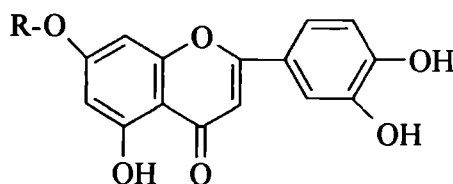
6.3.12. Vitamina P

S-a constatat că în produsele naturale, acidul ascorbic este însoțit de o substanță care îi potențează activitatea anti-scorbutică. Această substanță acționează asupra permeabilității vaselor sangvine, de unde și numele de vitamina P (a permeabilității).

Vitaminele P sunt derivați de la flavonă (quercitina) și prezintă structura unor glicozide. Cele mai răspândite în natură sunt **rutina** și **hesperidina**. Componenta glucidică a celor doi derivați este un dizaharid numit rutinoză (R) format din ramnoză și glucoză.



rutina



hesperidina

Flavonoidele sunt foarte răspândite în regnul vegetal, mai ales în flori și fructe, însoțind acidul ascorbic în citrice, măceș, fructe de pădure. În organismul uman, flavonoidele stimulează biosinteza adrenalinei și asigură permeabilitatea vaselor sangvine și rezistența acestora la rupere, manifestă acțiune farmacodinamică intensificând tonusul cardiac și scăzând tensiunea arterială. Datorită structurii lor, este posibil să participe ca transportori de hidrogen în reacții de oxido-reducere, activitatea acestora fiind corelată cu cea a acidului ascorbic. Carența în vitamina P se manifestă prin fragilitatea vaselor sangvine, tulburări ale permeabilității acestora, hemoragii locale, etc.

6.4. Mineralele esențiale

Ca și vitaminele, anumite minerale sunt indispensabile într-o multitudine de funcții fiziologice și biochimice. Majoritatea mineralelor esențiale sunt distribuite în alimente astfel încât majoritatea indivizilor care se hrănesc echilibrat primesc necesarul de minerale prin alimentație. Cantitatea necesară pentru organism variază de la câteva grame pe zi (sodiu, calciu) la câteva miligrame pe zi (fier) la câteva micrograme pe zi (microelementele).

Tabelul 6.7. Clasificarea mineralelor esențiale în raport cu funcția pe care o îndeplinesc

Funcția	Mineralul
funcție structurală	calciu, magneziu, fosfat
implicare în funcțiile membranelor	sodiu, potasiu
grupare prostetică în enzime	cobalt, cupru, fier, molibden, seleniu, zinc
reglarea acțiunii hormonale	calciu, crom, iod, magneziu, mangan, sodiu, potasiu
cunoscut ca esențial, dar fără funcție elucidată	siliciu, vanadiu, nichel, staniu
cu efecte asupra organismului, dar fără esențialitate dovedită	fluor, litiu
prezent în alimente, dar toxic în exces	aluminiiu, arsen, antimoniu, bor, brom, cadmiu, cesiu, germaniu, plumb, mercur, argint, stronțiu

În general, carențele în minerale se întâlnesc atunci când alimentele provin dintr-o regiune unde solul prezintă deficiențe în unele minerale, de exemplu iod. Când alimentele provin din locuri diferite, apariția unei carențe minerale este improbabilă. O problemă des întâlnită este carența de fier, care apare de cele mai multe ori în cazul pierderilor masive de sânge (menstruații abundente), când este dificil să se refacă stocul de fier numai prin alimentație. Alimentele care provin de pe soluri bogate în seleniu sunt toxice, iar consumul unor alimente bogate în sare (NaCl) pot cauza hipertensiune la indivizii predispuși.

7. Zaharidele

Zaharidele (carbohidrați, glucide) sunt larg răspândiți în organismele vegetale și animale, având importante roluri structurale și metabolice. În plante, glucoza este biosintetizată din CO_2 și H_2O în procesul de fotosinteză și este stocată sub formă de amidon sau utilizată pentru sinteza celulozei, care constituie componentul principal structural al plantelor. Animalele pot sintetiza zaharide numai din lipide sau aminoacizi, însă marea parte a zaharidelor animale provin din hrană. Glucoza este cel mai de seamă monozaharid; astfel, cea mai mare parte din glucidele ingerate prin alimentație este absorbită în fluxul sanguin sub formă de glucoză; alte zaharuri sunt transformate în glucoză la nivelul ficatului. Glucoza reprezintă „carburantul” metabolic al tuturor mamiferelor (cu excepția rumegătoarelor) și un „carburant” universal pentru toți embrionii. Glucoza este precursor în sinteza tuturor celorlalte zaharide din organism: glicogenul (stocare), riboză și deoxiriboză (structura acizilor nucleici), galactoză (componentă a lactozei, dizaharidul din lapte). Zaharidele intră în alcătuirea glicolipidelor, glicoproteinelor și proteoglicanilor. Maladii asociate cu metabolismul zaharidelor includ: diabetul zaharat, galactozemia, intoleranța lactozică, defecte ale stocării glicogenului, etc.

Zaharidele sunt biomolecule foarte răspândite în lumea vie, atât în regnul vegetal cât și animal. Au fost denumite și **carbohidrați**, deoarece raportul atomic dintre C, H și O este $\text{C}_n(\text{H}_2\text{O})_n$, formulă valabilă pentru majoritatea substanțelor din această clasă. Excepție fac unele substanțe care nu corespund formulei de mai sus (ramnoză, fucoză, deoxiriboză). Deși din punct de vedere chimic aceste substanțe nu sunt hidrați, neconținând molecule intacte de apă, termenul a persistat și continuă să fie utilizat. Pe lângă denumirea de **zaharuri** sau **zaharide**, provenită de la cuvântul latinesc *saccharum* (substanță dulce) există și denumirea de **glucide** provenită de la grecescul *glycos* (dulce). Nici aceste denumiri nu corespund pe deplin, deoarece există substanțe din această clasă care nu au gust dulce (celuloza, amidonul). Pe de altă parte, există și substanțe care nu fac parte din această clasă (ciclamatul de sodiu, zaharina, aspartamul) care sunt mai dulci decât zahărul. Din punct de vedere al structurii chimice, glucidele sunt **compuși polihidroxi-monocarbonilici și derivați ai acestora**.

Clasificarea zaharidelor

- 1) **Monozaharidele** sunt acei carbohidrați care nu pot fi hidrolizați în alți carbohidrați mai simpli. Se mai numesc și **oze** și pot fi clasificate în **trioze**, **tetroze**, **pentoze**, **hexoze** sau **heptoze**, în funcție de numărul atomilor de carbon din moleculă, sau ca **aldoze** și **cetoze** de în funcție de natura grupării carbonil din moleculă (aldehidă sau respectiv cetonă). Astfel, putem avea **aldotrioze**, **aldotetroze**..., **cetotrioze**, **cetotetroze**..., etc. Principalele aldoze și cetoze sunt prezentate în Figurile 7.1 și respectiv 7.2.
- 2) **Dizaharidele** reprezintă produși de condensare alcătuiți din două unități monozaharidice (maltoza, sucroza).
- 3) **Oligozaharidele** reprezintă produși de condensare alcătuiți din 2-10 unități monozaharidice.

4) **Polizaharidele** reprezintă produși de condensare alcătuiți din peste zece unități monozaharidice; în general, polizaharidele naturale (amiloză, amilopectină, dextrine, celuloză) conțin 100-3000 unități, putând fi liniare sau ramificate. Polizaharidele pot fi clasificate ca pentozani, hexozani, în funcție de structura monozaharidelor componente.

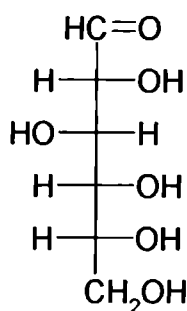
Rolul zaharidelor. În organismele vii zaharidele îndeplinesc roluri variate:

- **Rol energetic.** În organismul animal și uman carbohidrații furnizează până la 70% din energia totală.
- **Rol de substanță de rezervă.** În organismele animalelor superioare și al omului glucoza se stochează sub formă de glicogen hepatic și muscular. La plante, forma majoră de stocare o constituie amidonul.
- **Rol plastic.** Zaharidele îndeplinesc rolul de substanțe structurale și de susținere. La plante, celuloza este principalul component din pereții celulari. Membrana celulară animală conține glicoproteine, iar substanța fundamentală intercelulară este formată din proteoglicani.
- **Rol în detoxifiere.** Acizii uronici obținuți prin oxidarea ozelor participă în procesul de detoxificare la nivelul ficatului.
- **Constituent al unor substanțe fundamentale.** Acizii ribonucleici (ARN) și deoxiribonucleici (ADN), precum și o serie de coenzime (ATP, NAD^+ , NADP^+ , FMN, FAD) au în constituția lor oze.

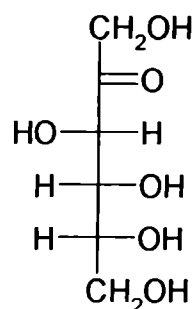
7.1. Monozaharidele (ozele)

7.1.1. Structura și izomeria ozelor (monozaharidelor)

Structurile chimice ale monozaharidelor sunt reprezentate în mod curent prin proiecții Fischer.

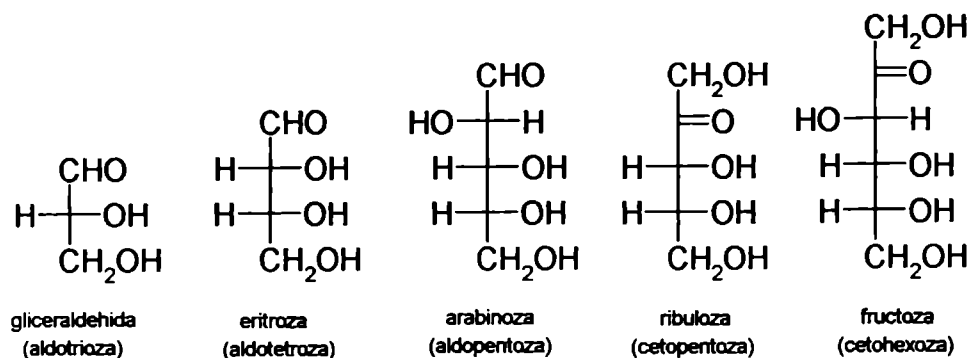


D-glucoza (aldohexoză)
2R,3S,4R,5R,6-pentahidroxihexanal



D-fructoza (cetohehexoză)
1,3S,4R,5R,6-tetrahidroxihexan-2-onă

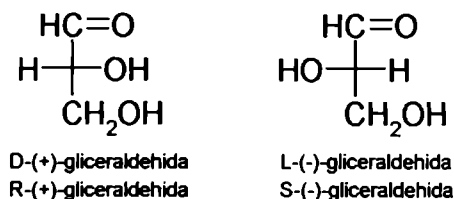
Un monozaharid poate fi o polihidroxialdehidă (**aldoză**) sau o polihidroxicetonă (**cetoză**). Monozaharidele sunt clasificate și în funcție de numărul atomilor de carbon din molecula lor în **trioze** (trei atomi de carbon), **tetroze** (patru atomi de carbon), **pentoze** (cinci atomi de carbon), **hexoze** (șase atomi de carbon), **heptoze** (șapte atomi de carbon).



O polihidroxialdehidă cu șase atomi de carbon cum este glucoza este o **aldohexoză**, în timp ce o polihidroxicetonă cu șase atomi de carbon, cum ar fi fructoza, este o **cetohexoză**. Majoritatea zaharidelor naturale derivă de la aldoze, iar cele mai răspândite aldoze sunt aldopentozele și aldohexozele.

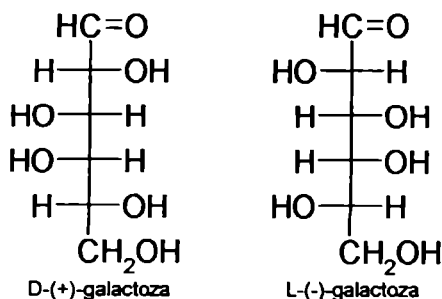
Stereochimia și notația configurațională a monozaharidelor

Cea mai simplă aldoză este gliceraldehida, o aldotrioza. Deoarece gliceraldehida posedă un centru de chiralitate (carbon asimetric), ea poate exista sub forma a doi enantiomeri, unul dextrogir (+), celălalt levogir (-). Descrierea completă a stereoisomerilor, prin care se face specificarea configurației absolute a enantiomerilor utilizează sistemul R-S.



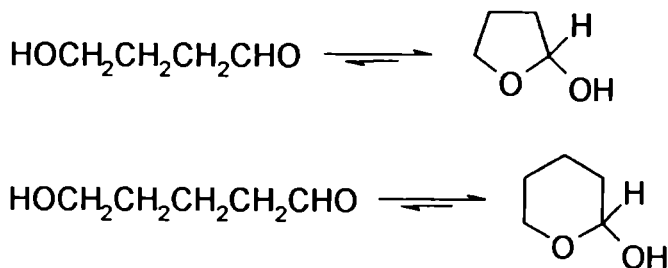
În chimia carbohidraților, se utilizează un sistem mai vechi de notare a configurației, în care cei doi enantiomeri ai gliceraldehidei sunt notați D-(+)-gliceraldehida și L-(-)-gliceraldehida. În acest

sistem, *monozaharidele care au la carbonul asimetric cel mai îndepărtat de gruparea carbonil aceeași configurație cu D-(+)-gliceraldehida aparțin seriei D, în timp ce monozaharidele care au la carbonul asimetric cel mai îndepărtat de gruparea carbonil aceeași configurație cu L-(-)-gliceraldehida aparțin seriei L*. Aproape toate glucidele din natură aparțin seriei D. Enantiomerul unui monozaharid din seria D va aparține seriei L. (D- L, ca și R-S indică doar configurația la centrul chiral, dar nu indică sensul activității optice. De exemplu, D-glucoza este *dextro*, pe când D-fructoza este *levo*. Cu alte cuvinte, activitatea optică este o proprietate fizică, pe când D-L, R-S sunt reprezentări convenționale ale structurii unor molecule).



Un compus cu n centre chirale va avea un maxim de 2^n izomeri optici. Prin urmare, există 2 aldotrioze, 4 aldotetroze, 8 aldopentoze și 16 aldohexoze. Jumătate din acești compuși aparțin seriei D, jumătate aparțin seriei L.

Compușii hidroxicarbonilici cu o grupare OH în poziția 4 sau 5 față de gruparea carbonili există preponderent în formă ciclică hemiacetalică (hemicetalică, în cazul cetonei).



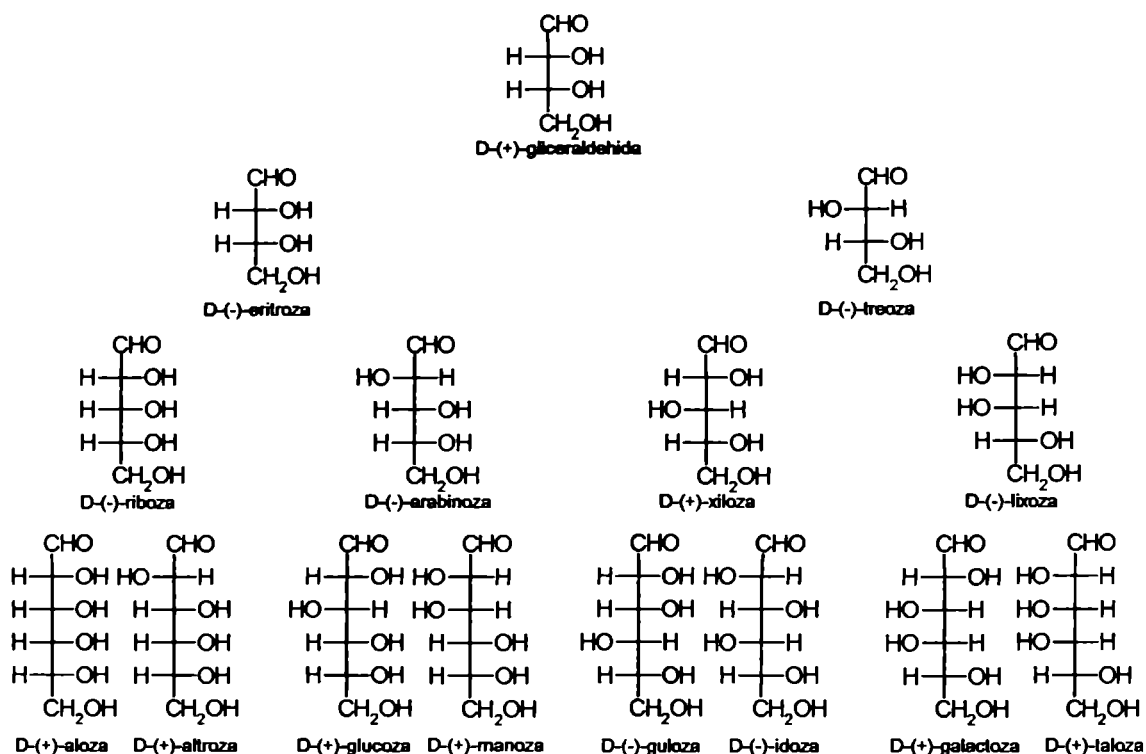


Figura 7.1. Structura aldozelor din seria D.

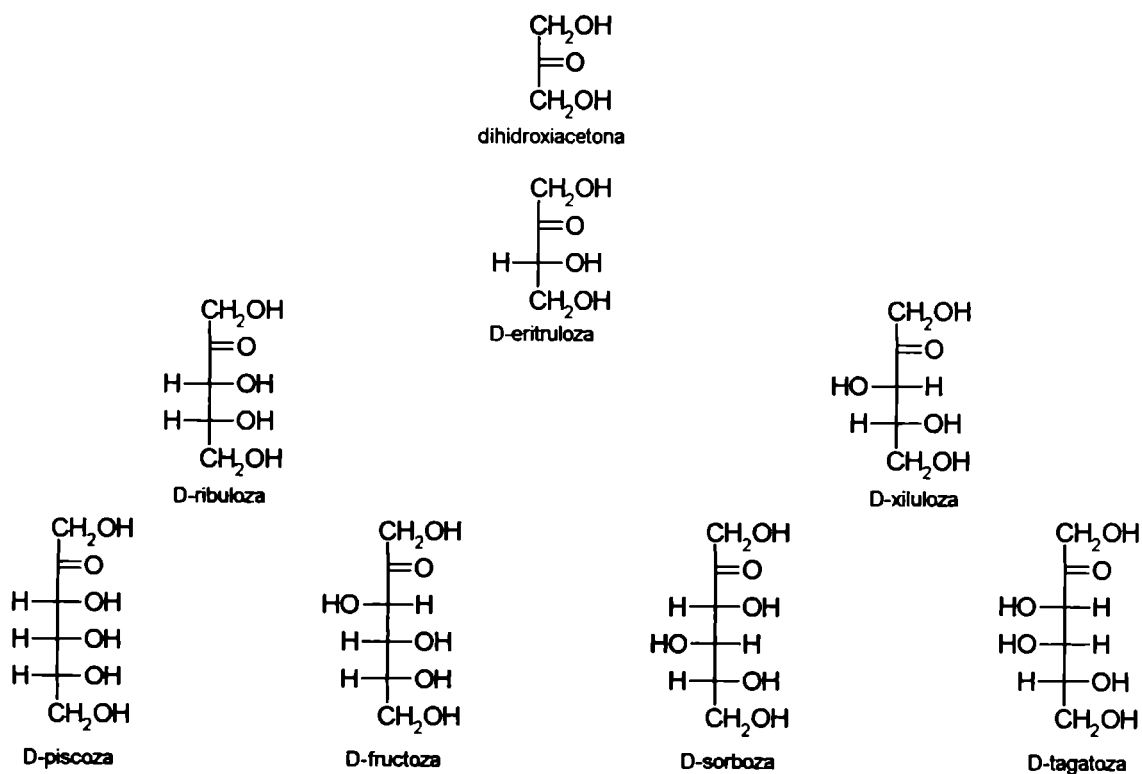
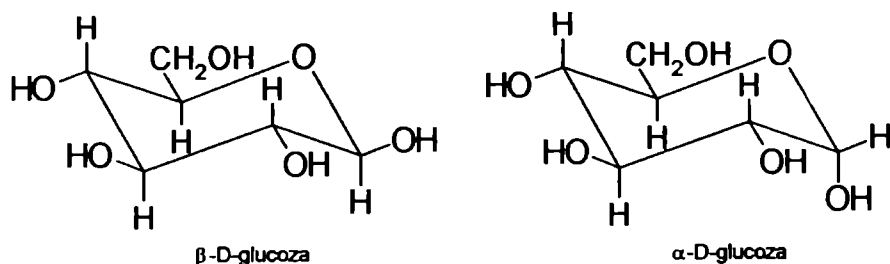


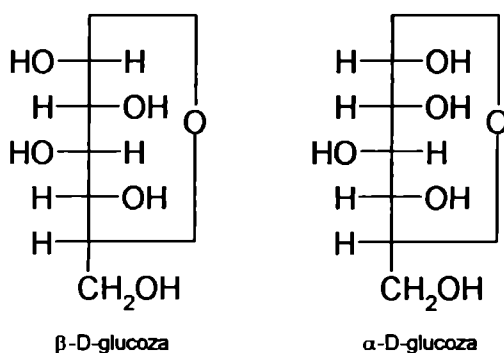
Figura 7.2. Structura cetozelor din seria D.

Monozaharidele formează și ele astfel de forme ciclice, în care *fosta grupare carbonil devine un nou centru chiral*. Astfel, există două forme ciclice izomere ale glucozei:

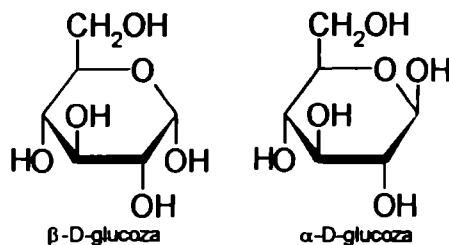


Cei doi izomeri ciclici diferă numai prin configurația la *carbomul hemiacetalic C-1*. Astfel de izomeri sunt denumiți **anomeri**. Cei doi anomeri sunt denumiți α și β , de exemplu α -D-glucoza și β -D-glucoza. (În cazul aldohexozelor, anomerul β are OH-ul de la C-1 *cis* față de gruparea CH₂OH).

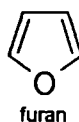
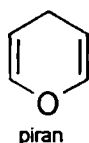
Deseori se folosesc proiecțiile Fischer modificate pentru a reprezenta formele hemiacetalice. De exemplu, anomerii D-glucozei pot fi reprezentați:



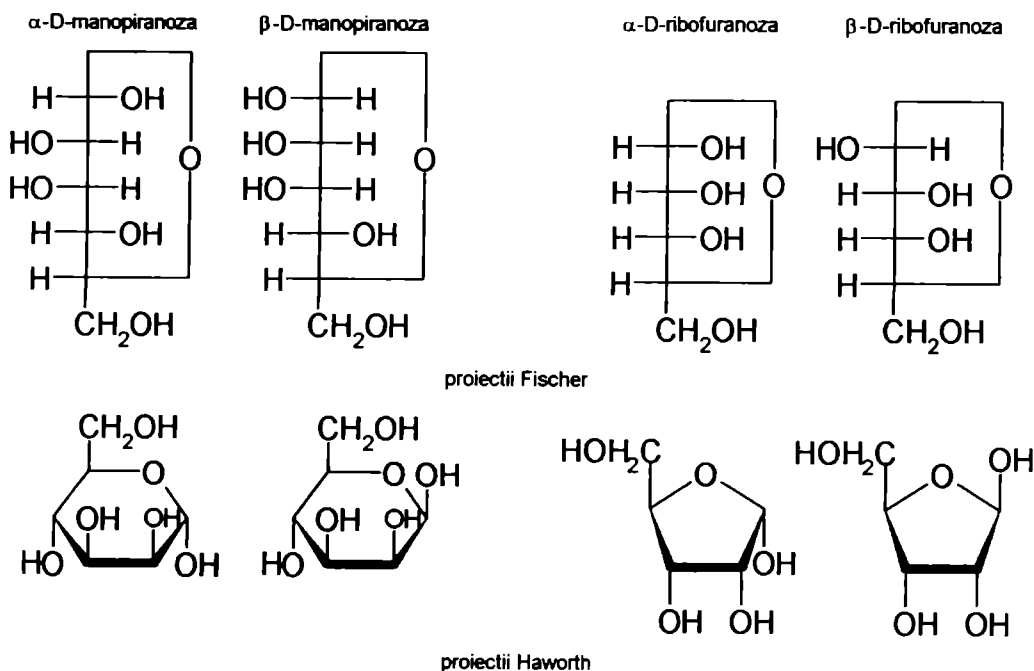
În această reprezentare, OH-ul de la C-1 este scris la dreapta pentru anomerul α și la stânga pentru anomerul β . Haworth a introdus formule alternative de proiecție, care sunt utilizate foarte des în chimia carbohidraților. În proiecțiile Haworth, ciclul este reprezentat ca un hexagon plan cu atomul de oxigen în colțul din dreapta sus, cu carbonul animeric în dreapta și cu gruparea CH₂OH în colțul din spate-stânga în sus. Grupările desenate în proiecțiile Fischer *spre stânga* sunt reprezentate în proiecțiile Haworth *în sus*, și invers.



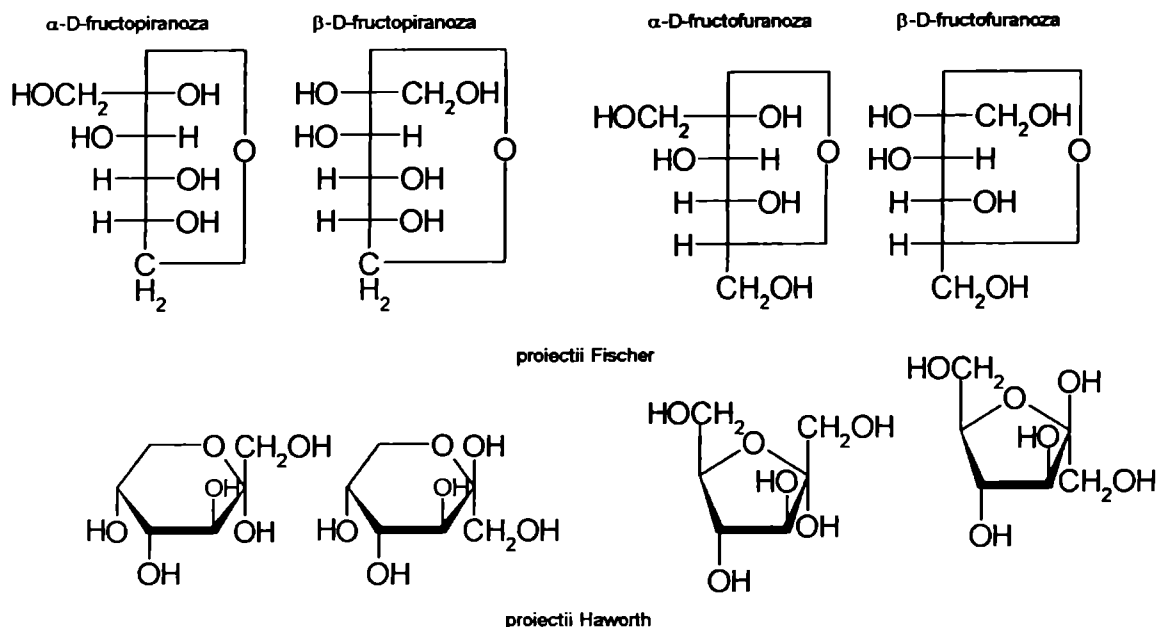
Ciclul de șase atomi de carbon dintr-un monozaharid este denumit **piranoză**, de la numele celui mai simplu compus heterociclic cu un astfel de inel (piran). Astfel, β -D-glucopiranoză este complet denumită β -D-glucopiranoză. Deși monozaharidele libere există în special în formă piranozică și mai rar ca cicluri de cinci atomi, în derivați ele pot avea și astfel de structuri. Ciclul de cinci atomi se numește **furanoză**, de la numele compusului heterociclic furan.



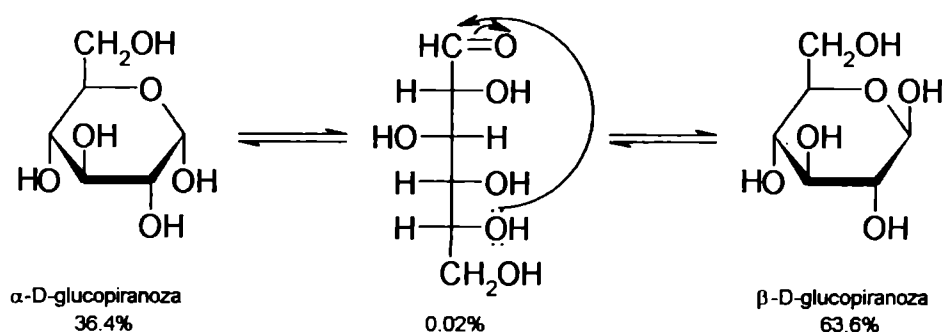
O D-furanoză în reprezentare Haworth este desenată oxigenul în vârful penagonului, cu carbonul anomic pe partea dreaptă a moleculei și cu gruparea CH_2OH *în sus*.



Și cetozele există predominant în forma ciclică. D-Fructoza de exemplu formează un ciclu hemiacetalic de cinci atomi sau de șase atomi. Forma piranozică este predominantă în monozaharida liberă, în timp ce forma furanozică se întâlnește în dizaharide (zaharoză) sau polizaharide (inulină).



β -D-glucoza pură are rotația specifică $[\alpha]_D = +18.7^\circ$; anomerul α are $[\alpha]_D = +112^\circ$. Ambii anomeri au fost izolați în stare pură. Când oricare dintre anomeri este dizolvat în apă, rotația optică a soluției se schimbă treptat până se atinge o valoare de echilibru de $+52.7^\circ$. Acest fenomen se datorează interconversiei celor doi anomeri în soluție și se numește **mutarotație**. La echilibru, soluția conține 63.6% anomer β (mai stabil) și 36.4% anomer α . În soluție mai sunt prezenți în cantitate foarte mică și anomerii α și β ai glucofuranoei (mai puțin de 3%)



Din punct de vedere biomedical, glucoza reprezintă cel mai important monzaharid. În soluție, glucoza este dextrogiră, motiv pentru care mai este denumită și **dextroză**, denumire des utilizată în practica

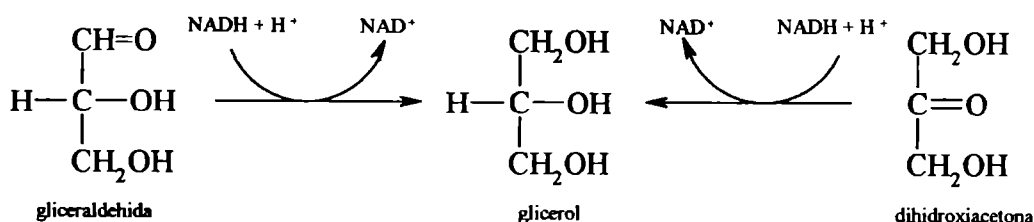
clinică. În organismul uman și animal seria D a aldazelor se oprește la aldohexoze, importante fiind pentozele și hexozele: riboza, arabinoza, glicoza, manoza și galactoza. Din seria D a cetozelor, cele mai importante pentru organismul uman sunt dihidroxiacetona, ribuloza și fructoza.

7.1.2. Proprietăți chimice ale monozaharidelor

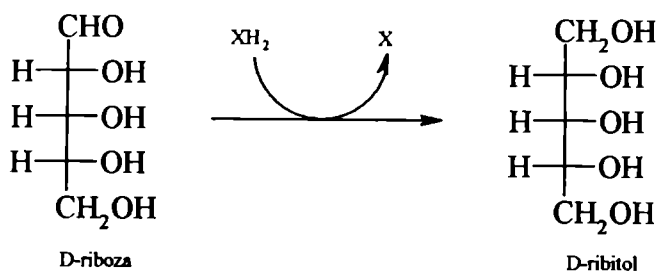
Proprietățile chimice ale monozaharidelor sunt determinate de prezența grupărilor carbonil și hidroxil. În cele ce urmează vor fi prezentate câteva reacții semnificative pentru transformările metabolice.

Reacții datorate grupării carbonil

Reducerea. Gruparea carbonil a ozelor se poate transforma prin reducere în gruparea hidroxil, formându-se polioli corespunzători (alditoli). Procesul are loc *in vitro* sub acțiunea diversilor agenți reducători (NaBH_4 , Na-Hg/H^+) sau *in vivo*, cu ajutorul unor enzime NADH-dependente. Prin reducerea gliceraldehidei sau dihidroxiacetonei se formează glicerol, intermediar important în biosinteza de trigliceroli și glicerofosfolipide.



Prin reducerea ribozei se obține ribitolul, polioli care se întâlnește în structura vitaminei B₁₂.



În aceleași condiții D-glucoza se reduce la D-sorbitol, iar D-fructoza formează doi polioli: D-sorbitol și D-manitol. D-Sorbitolul reprezintă o substanță de bază în sinteza vitaminei C. În diabetul zaharat, formarea de D-sorbitol în retină contribuie la instalarea retinopatiei diabetice.

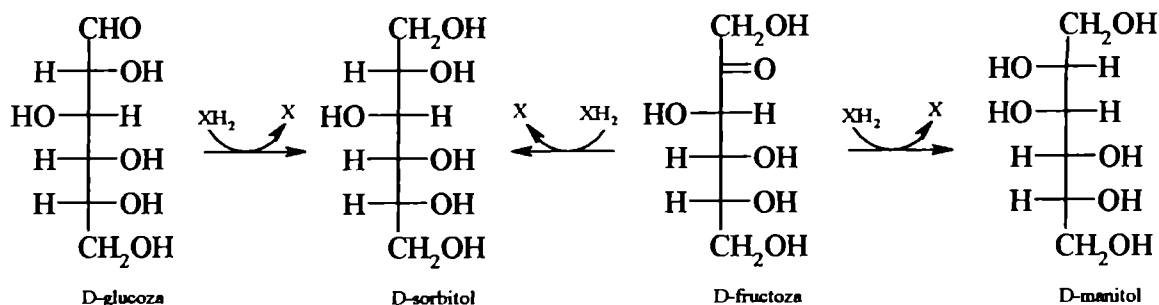
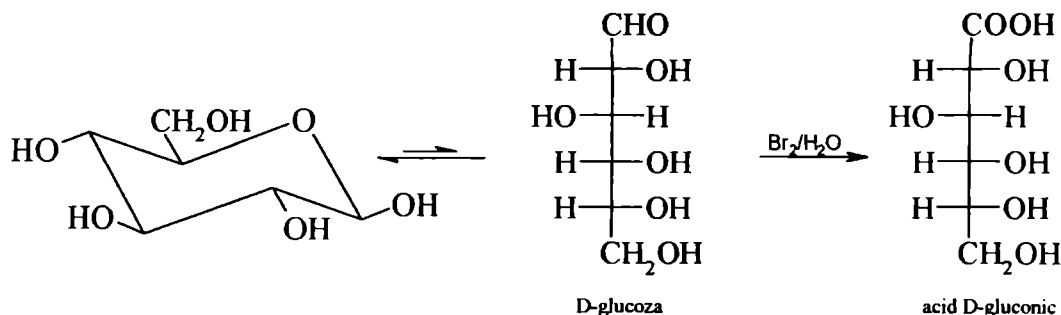


Figura 6.3. Reducerea glucozei și fructozei. $\text{XH}_2 = \text{NADH} + \text{H}^+$, $\text{X} = \text{NAD}^+$.

Oxidarea

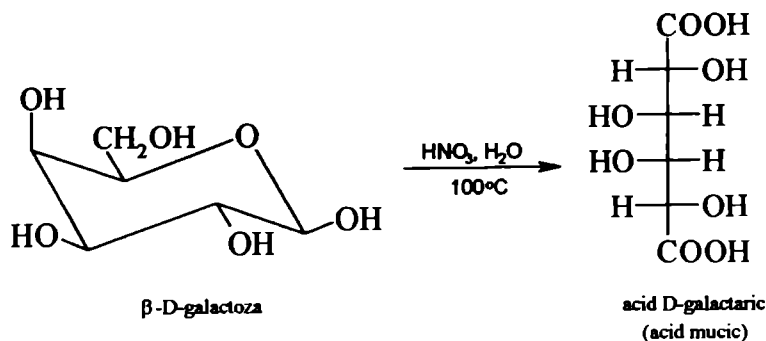
Prin oxidarea monozaharidelor se obțin produși de oxidare care diferă prin gradul de oxidare a grupării carbonil sau alcool primar.

Prin **oxidarea blândă *in vitro*** (cu apă de brom, reactiv Tollens sau reactiv Fehling) se obțin **acizi aldonici** (acid gluconic, galactonic, manonic, etc.).

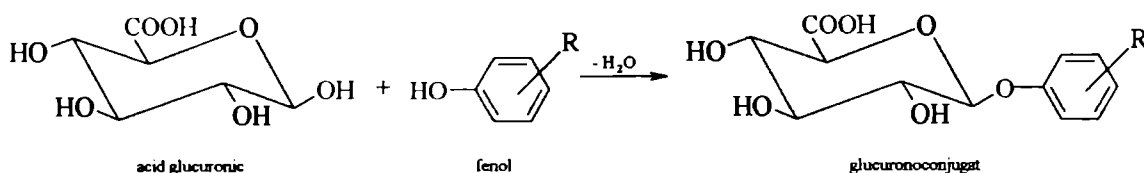


In vivo are loc oxidarea esterului glucozo-6-fosforic la acid 6-fosfogluconic sub acțiunea catalitică a glucozo-6-fosfat dehidrogenazei (NADP^+ -dependentă). Această reacție reprezintă prima etapă în calea pentozo-fosfaților. Gluconatul de calciu reprezintă o formă asimilabilă a calciului.

Prin **oxidarea energetică** cu HNO_3 concentrat sunt oxidate atât gruparea carbonil de la C-1, cât și gruparea de alcool primar de la C-6, rezultând **acizii aldarici (zaharici)**. De la glucoză rezultă acidul glucaric (glucozaharic), de la galactoză, acidul galactaric (galactozaharic sau mucic), etc.



Oxidarea grupării alcool primar de la C-6 poate avea loc după o prealabilă protejare a grupărilor OH secundare și a OH-ului hemiacetalic, cu obținerea de **acizi uronici**. În organism, această oxidare se face enzimatic, sub acțiunea uronidazelor. Acizii uronici au un rol important în procesele de detoxificare la nivelul ficatului. Acidul glucuronic prezintă un interes deosebit în gluconoconjugare, proces prin care ficatul intervine în eliminarea unor compuși exogeni, sau produși în intestin, ca de exemplu: fenoli, rezultați din diverși compuși aromatici la nivelul intestinului, sub acțiunea florei microbiene, indoxilul format din triptofan, medicamente, toxine accidentale, etc.

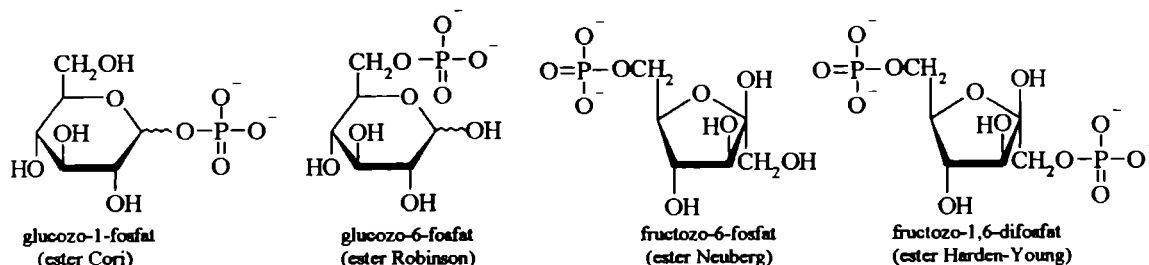


Acidul glucuronic acționează asupra unor substanțe formate endogen ca bilirubina, hormonii sexuali, corticosuprarenali, tiroidieni. Acidul glucuronic se leagă de substanța al cărei efect toxic îl neutralizează, prin conjugare realizându-se două lucruri: scade toxicitatea și crește solubilitatea în apă a compusului toxic, care poate fi transportat astfel mai ușor spre căile de excreție. În afară de participarea sa la procesul de detoxificare hepatică, acidul glucuronic este important datorită implicării sale în biosinteza glicozaminoglicanilor, compuși cu roluri majore în organismul uman și animal. Acidul glucuronic reprezintă unul din metaboliții importanți rezultați pe calea acizilor uronici, proces anabolic important în metabolismul glucidic.

Proprietăți chimice datorate grupărilor OH

Esterificarea. Grupările OH din oze (primare, secundare și hemiacetalică) pot fi esterificate. Din punct de vedere biochimic, cei mai importanți sunt esterii fosforici ai OH-ului primar sau hemiacetalic. Majoritatea monoglucidelor sunt reactive sub formă de esteri fosforici putând participa în

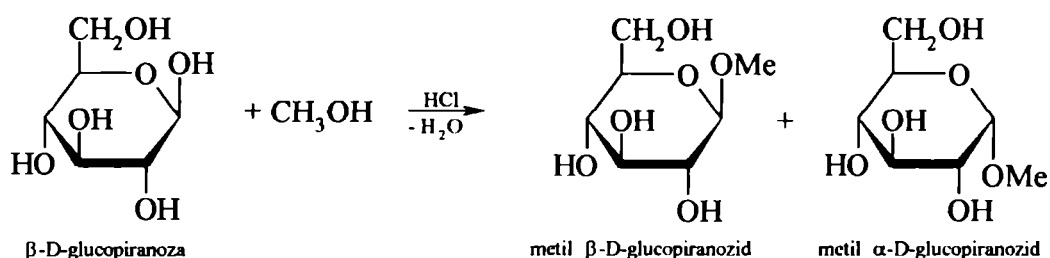
diverse procese metabolice, lucru care nu este posibil în cazul ozelor libere. În organismul uman și animal, cei mai importanți esteri fosforici sunt glucozo-1-fosfat, glucozo-6-fosfat, fructozo-6-fosfat, fructozo-1,6-difosfat, care reprezintă produși intermediari ai metabolismului carbohidraților.



Există și esteri ai acidului sulfuric întâlniți sub formă de componente ale proteoglicanilor (heparina, condroitin sulfatii, dermatan sulfatii). Esterificarea proteoglicanilor are loc sub acțiunea fosfoadenozil-5-fosfatului (PAPS) care este donator de grupări sulfat.

Formarea glicozidelor

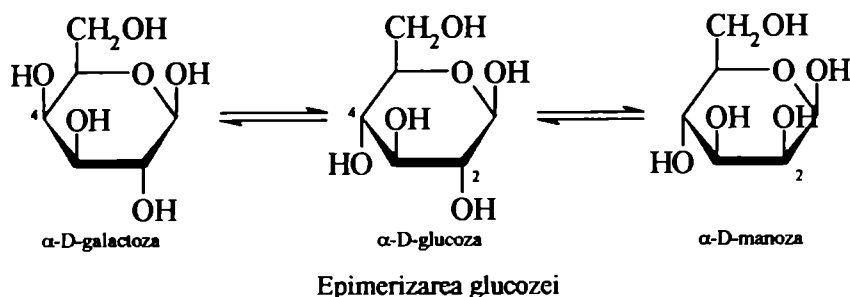
Gruparea OH hemiacetalică este mult mai reactivă decât grupările OH alcoolice, putând forma cu alți compuși care conțin o grupare OH (alcooli, oze) compuși de tip acetalic (sau cetalic, în cazul cetozei) numiți **glicozide**. Glicozidele pot exista ca și ozele sub forma a doi numeri, α și β . Dacă glicozidele provin de la glucoză, se numesc **glucozide**, dacă provin de la galactoză, **galactozide**, etc.



Dacă acetalizarea se face cu gruparea OH a altei oze, se obțin oligo- și poliglucide. În cazul în care reacția are loc cu o componentă neglucidică (**aglicon**), se formează O-, S- sau N-glicozide, în funcție de gruparea care participă la reacție. De exemplu, nucleozidele sunt N-glicozide ale D-ribozei sau D-deoxiribozei în care agliconul este o bază purinică sau pirimidinică (vezi Capitolul 9). Glicozidele sunt larg răspândite în natură, partea agliconică putând fi metanol, glicerol, steroli, etc. Importante din punct de vedere farmaceutic sunt glicozidele cardiotonice, care au steroli pe post de agliconi. Când sunt

administrare în insuficiența cardiacă, glicozidele cardiotonice scad frecvența și măresc intensitatea bătailor inimii. Unele glicozide, cum ar fi streptomicina au proprietăți antibiotice.

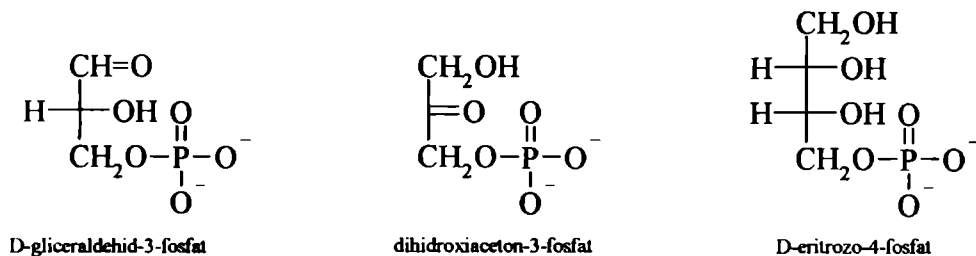
Epimerizarea ozelor. Epimerii sunt stereoisomeri care diferă prin configurația unui singur atom de carbon asimetric. Epimeri ai glucozei importanți din punct de vedere biologic sunt manoză și galactoză. Epimerizarea glucozei este un proces important din punct de vedere metabolic. Are loc în special la nivelul ficatului și este catalizat de o enzimă numită epimerază.



7.1.3. Principalii reprezentanți ai monozaharidelor

Trioze și tetroze

Principală trioză este **gliceraldehida** care având un singur centru chiral se prezintă sub forma a doi stereoisomeri. Prin convenție cei doi enantiomeri au fost denumiți D și L-gliceraldehida, și reprezintă compuși de referință pentru determinarea configurațiilor relative ale compușilor din seriile D și L. Triozele nu se găsesc libere în natură, ci ele rezultă ca intermediari metabolici, formându-se continuu în organism sub formă de esteri fosforici în procesul de glicoliză.



Dintre tetroze prezintă interes biologic D-eritroz-4-fosfatul, care apare intermediar în calea pentozofosfaților, proces al metabolismului glucidic.

Pentoze

Pentozele sunt larg răspândite în regnul vegetal, intrând în alcătuirea unor biopolimeri numiți pentozani (arabani, xilani), fără valoare alimentară pentru om. În organismul animal și uman pentozele se găsesc sub formă de esteri fosforici, constituenți ai nucleotidelor și deci ai acizilor nucleici și ai unor enzime importante (vezi Tabelul 7.1).

Riboza, principalul reprezentant al pentozelor, este sintetizat în toate organismele pe „calea pentozofosfaților”. **Riboza**, în forma β -D-furanozică, este componentul structural al nucleotidelor, nucleozidelor, acidului ribonucleic (ARN), 3',5'-AMP-ciclic, ATP și a unor coenzime importante ca NAD^+ , NADP^+ , FAD, Coenzima A. **Deoxiriboza** are gruparea OH de la C-2 substituită cu un atom de hidrogen și intră în constituția ADN și a nucleotidelor corespunzătoare. Prin reducerea enzimatică a ribozei se obține **ribitolul**, component structural al riboflavinei (vitamina B_2).

Tabelul 7.1. Pentoze cu importanță fiziologică

Pentoza	Răspândire	Importanță biochimică	Semnificație clinică
D-riboza	Acizi nucleici	Element structural al acizilor nucleici și al coenzimelor NAD^+ , NADP^+ , FAD, ATP, intermediari în „calea pentozofosfaților”	
D-ribuloza	Formată în procese metabolice	Ribulozo-fosfatul este un intermediar în „calea pentozofosfaților”	
D-arabinoza	Guma arabică. Clei de prun și cireș	Constituent al glicoproteinelor	
D-xiloza	Gume arboricole, proteoglicani, glicozaminoglicani	Constituent al glicoproteinelor	
D-lixoza	Mușchiul cardiac	Constituent al lixoflavinelor izolate din mușchiul cardiac	
D-xiluloza	Intermediar în „ciclul acizilor uronici”		Prezentă în urină în cazurile de pentozurie esențială

Există o **pentozurie alimentară** temporară, întâlnită după ingestia unor alimente bogate în pentoze sau pentozani (cireșe, vișine, prune) care se manifestă prin excreția urinară a unor pentoze (riboză, arabinoză, xiloză). De asemenea, există o maladie ereditară numită **pentozurie esențială** care constă în eliminarea de L-xiluloză, care se datorește sintezei hepatice deficitare sau absenței totale a unei enzime din „ciclul acizilor uronici”, **xilitoldehidrogenaza**.

Hexoze

Hexozele sunt cele mai răspândite oze, existând fie sub formă liberă, fie sub formă de oligo- sau polizaharide, glicozide, etc. Cel mai important reprezentant al hexozelor este **glucoza**, care în organismul uman și animal are o origine exogenă, alimentară (provine prin hidroliza enzimatică a dizaharidelor zaharoză, maltoză, lactoză, celobioză sau a polizaharidelor amidon, celuloză, glicogen) și una endogenă, când este rezultatul procesului de glicogenoliză sau de epimerizare. Glucoza absorbită prin intestin este transportată prin vena portă la ficat, unde urmează trei căi diferite:

- o parte este metabolizată pentru eliberarea energiei necesare proceselor vitale;
- o parte este depozitată sub formă de glicogen hepatic și muscular;
- o parte este eliberată în sânge și distribuită tuturor organelor și țesuturilor. În organism transportul glucozei este asigurat de sânge. Concentrația glucozei în sânge este menținută între 10-110 mg/ml și orice scădere (hipoglicemie) sau creștere (hiperglicemie) dincolo de aceste limite constituie consecințele unor tulburări metabolice grave.

Acidul glucuronic este unul din derivații importanți ai glucozei utilizat în procesul de detoxificare, dar și unul din componenții structurali ai proteoglicanilor.

Manoza nu se găsește liberă în natură fiind constituent important al unor produși de condensare (**manani**), ai glicoproteinelor și al unor polizaharide bacteriene (bacilul Koch). În organism se mai găsește sub formă de manozo-6-fosfat.

Tabelul 7.2. Hexoze cu importanță fiziologică

Hexoza	Sursă	Importanță biochimică	Semnificație clinică
D-glucoză	Sucuri de fructe. Hidroliza amidonului, zaharozei, maltozei, lactozei	Zaharidul primordial al organismului.	Prezentă în urină (glicozurie) în diabetul zaharat, datorită hiperglicemiei
D-fructoză	Sucuri de fructe, miere. Hidroliza zaharozei și a inulinei	Poate fi transformat în glucoză la nivelul ficatului și metabolizat.	Intoleranța ereditară la fructoză provoacă acumularea fructozei și hipoglicemie
D-galactoză	Hidroliza lactozei	Poate fi transformat în glucoză la nivelul ficatului și metabolizat. Este sintetizată în glanda mamară pentru sinteza lactozei din lapte. Constituent al glicolipidelor și glicoproteinelor	Defecte în metabolizare conduc la galactozemie și cataractă
D-manoză	Hidroliza gumelor și mananilor vegetali	Constituent în numeroase glicoproteine	

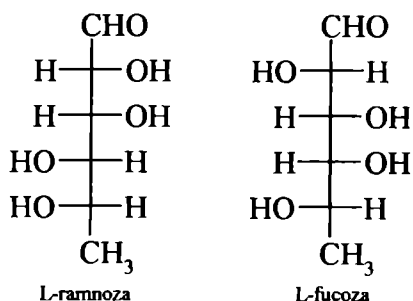
Galactoza este componentă structurală a lactozei, dizaharidul din lapte. În ficat se transformă ușor în glucoză sub acțiunea unei enzime. Galactoza intră în alcătuirea glicoproteinelor și a unor lipide complexe numite **cerebrozide** (vezi Capitolul 8), localizate în creier și sistemul nervos central.

Fructoza este o cetohehexoză care se află în stare liberă în lichidul seminal, fructe, flori și miere. Intră în alcătuirea zaharozei (zahărul alimetar) și a polizaharidului numit **inulină**, utilizată pentru explorarea filtratului glomerular. În celulele seminale există o cale specifică de transformare enzimatică a glucozei în fructoză, printr-o serie de procese de oxidoreducere. Esterii fosforici ai fructozei sunt intermediari importanți în metabolismul glucidic.

Deoxizaharuri

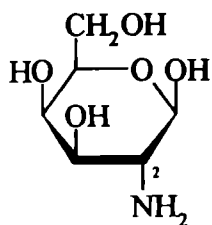
Deoxizaharurile sunt oze în care o grupare OH este înlocuită cu un atom de hidrogen.

2-D-Deoxiriboza este constituent al acizilor deoxiribonucleici (ADN). **L-ramnoza** (6-deoxi-L-manoza) se găsește în structura unor glicozide, dintre care cea mai importantă este vitamina P, care are în alcătuirea sa dizaharidul rutinoză, format din ramnoză și glucoză. **L-fucoza** (6-deoxi-L-galactoza) este constituent al glicoproteinelor, dintre care menționăm izoglutininele, implicate în reacții imunologice, și heteropolizaharidele grupelor sangvine. Atât ramnoza cât și fucoza sunt considerate a fi și **metilpentoze**. Un deoxizahar sintetic, **2-deoxiglucosa**, se utilizează experimental ca inhibitor al metabolismului glucozei.

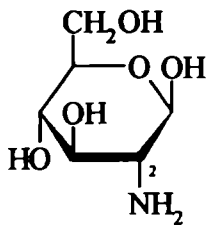


Aminozaharuri

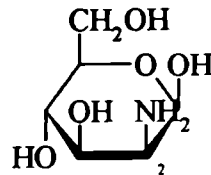
Aminozaharurile sunt derivați ai ozelor care rezultă din substituirea unei grupări OH de obicei de la C-2 cu o grupare NH₂. Hexozaminele sunt cele mai răspândite aminozaharide, ele fiind componente ale glicoproteinelor, ganglioizidelor și glicozaminogicanilor. Glucozamina este constituent al acidului hialuronic, iar galactozamina (condrozamina) al condroitin sulfatului. Atât glucozamina cât și galactozamina se întâlnesc sub formă de N-acetil derivați în structura unor glicoproteine.



α -D-galactozamina
(2-aminogalactopiranoza)

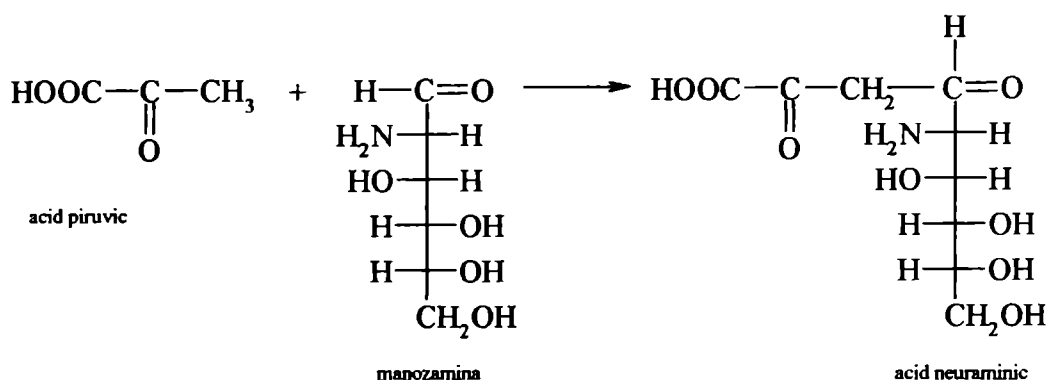


α -D-glucozamina
2-aminoglucopiranoza



α -D-manozamina
(2-aminomanopiranoza)

Acidul neuraminic este o cetoză cu 9 atomi de carbon care rezultă prin condensarea acidului piruvic cu D-manozamina.



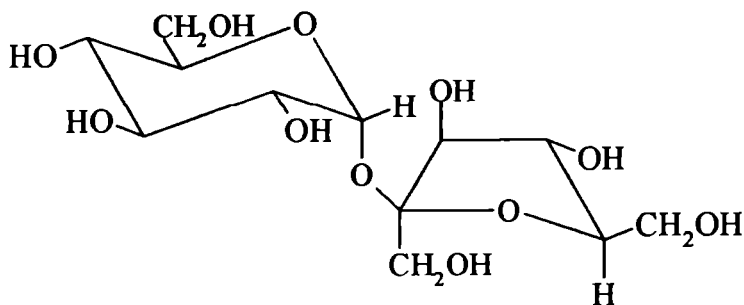
În plasmă au fost identificați derivați N-acilați ai acidului neuraminic numiți **acizi sialici**, componenți ai glicoproteinelor și glicolipidelor membranelor celulare. Agenții holerei, gripei și oreionului posedă o enzimă specifică, neuraminidaza sau sialidaza, care distruge receptorii membranari, îndepărtând specific legătura dintre acidul neuraminic și diverși constituenți ai membranei.

Aminozaharidele intră și în constituția unor antibiotice (eritromicină, carbomicină, gentamicină), având rol principal în activitatea antibiotică.

7.2. Dizaharidele

Oligozaharidele sunt alcătuite din 2-10 molecule de oze. Pentru organismul uman cele mai importante sunt dizaharidele rezultate prin condensarea hexozelor: zaharoză, maltoză, lactoză.

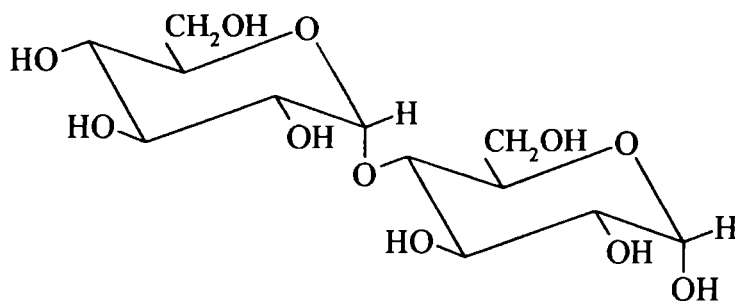
Zaharoza sau **sucroza** (α -D-glucopiranozil-1 $\rightarrow$ 2- β -D-fructofuranoza) este principalul dizaharid nereducător și reprezintă una din cele mai importante surse exogene de glucide pentru organismul uman (25%). Este sintetizată în exclusivitate de plante (trestia de zahăr, sfecla de zahăr).



zaharoza

Zaharoza este hidolizată la ozele componente de către enzima **sucrază (invertază)**. Sinteza deficitară de sucrază conduce la perturbări de absorbție, diaree și flatulență.

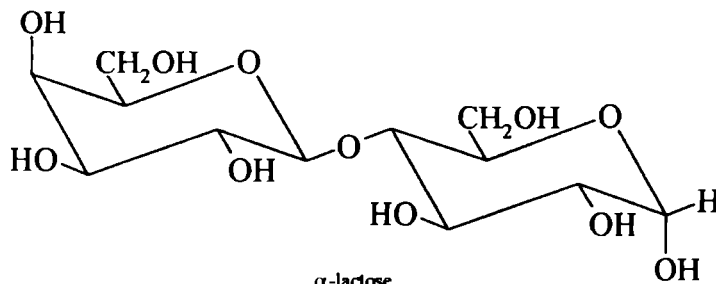
Maltoza (D-glucopiranozil-1→4- α -D-glucopiranoza) reprezintă un produs de degradare a amidonului și glicogenului, fiind unitatea repetitivă a celor două polizaharide.



α -maltoza

Maltoza poate fi eliberată din amidon și glicogen sub acțiunea hidrolitică a **amilazei** (salivară și pancreatică). Hidroliza maltozei sub acțiunea **maltazei** (α -glucozidază intestinală) ca și hidroliza acidă *in vitro* conduce la două molecule de α -D-glucoză.

Lactoza (β -D-galactopiranozil-1→4-D-glucopiranoză) este singurul dizaharid reducător existent în stare liberă în natură.



α -lactose

Este prezentă în laptele tuturor mamiferelor, secretată fiind de glanda mamară în proporții diferite (2-8%), în funcție de specie. Laptele de femeie conține 6.5%, iar cel de vacă 5% lactoză. Lactoza este hidrolizată până la ozele componente de către **lactază** (β -galactozidază), o enzimă localizată în intestin. Sinteza deficitară de lactază conduce la perturbări de absorbție, diaree și flatulență. Galactoza este ulterior convertită în glucoză de enzima **galactowaldenază**. Galactozemia esențială este o maladie genetică însoțită de galactozurie frecventă în primele zile de viață ale copilului provocată de sinteza deficitară la nivelul ficatului a galactowaldenazei.

7.3. Polizaharidele

Polizaharidele sau glicanii sunt biopolimeri constituiți dintr-un număr mare (100-3000) de oze sau derivați ai acestora (glucozamină, galactozamină, acizi uronici, acizi sialici) legate între ele prin legături glicozidice. Prin hidroliză enzimatică sau acidă, polizaharidele sunt scindate în produși cu grad de condensare din ce în ce mai mic, iar în final la monozaharidele de bază. Există două categorii de polizaharide:

- 1) **Homoglicani** – polizaharide omogene – alcătuiți dintr-un singur fel de unitate structurală (amidon, glicogen, celuloză).
- 2) **Heteroglicani** – polizaharide neomogene – alcătuiți din mai multe tipuri de unități structurale, unele putând fi componente neglucidice. Din grupul heteroglicanilor fac parte glicoproteinele, proteoglicanii și polizaharidele bacteriene.

Glicanii îndeplinesc roluri structurale (celuloza, proteoglicanii) sau de depozitare a rezervelor energetice (amidonul, glicogenul).

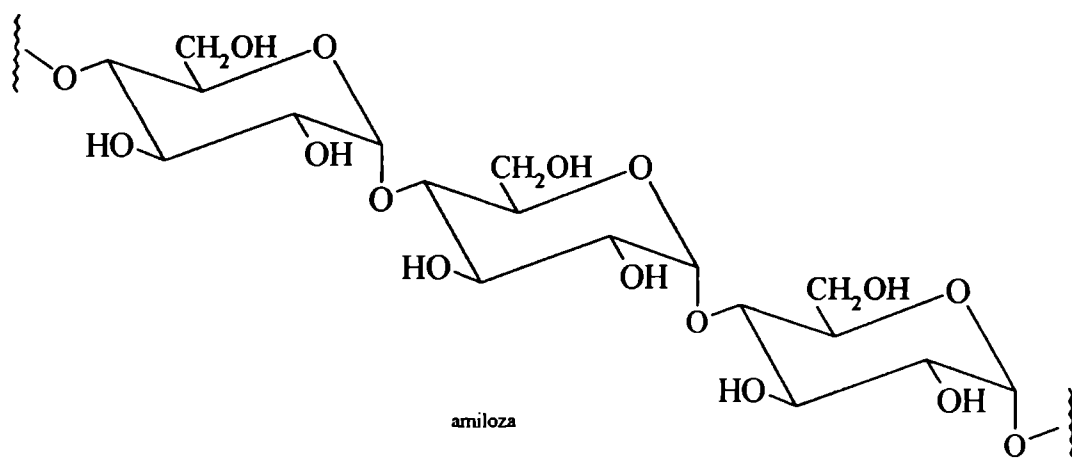
7.3.1. Homoglicanii

Formula generală a polizaharidelor omogene este $-(C_6H_{10}O_5)_n-$, unde $n = 300-1000$. Sunt de origine vegetală sau animală.

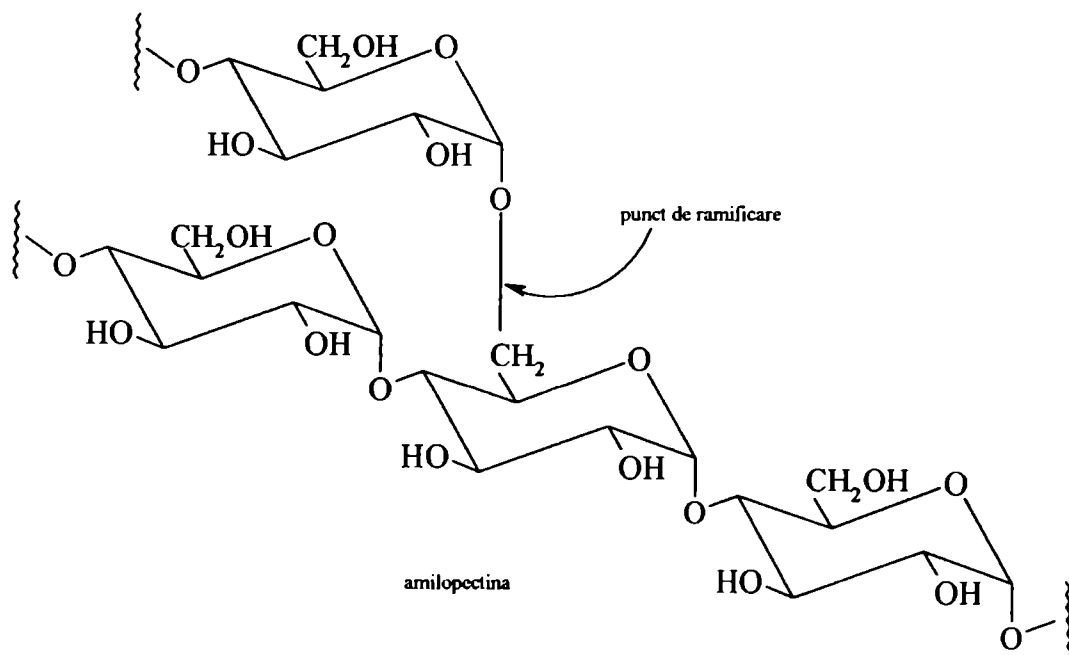
Amidonul este polizaharidul de rezervă al regnului vegetal. Este un homopolimer al α -D-glucopiranozei, numit **glucozan** sau **glucan**, reprezentând cel mai abundent carbohidrat alimentar din cereale, cartofi, legume, etc. Amidonul este o componentă principală a rației alimentare a omului și constituie 50% din glucoza exogenă. Prin hidroliza enzimatică progresivă a amidonului se formează produși intermediari numiți **dextrine** și în final, **maltoză** și **glucoză**.

Amidonul nu este o substanță unitară, ci un amestec de două substanțe distincte: **amiloza** (15-20%) și **amilopectina** (80-85%). Amiloza are o structură liniară formată din resturi de α -D-

glucopiranoză legate prin legături glicozidice α -(1 $\rightarrow$ 4). Lanțurile lungi, neramificate ale amilozei se organizează spațial într-o conformație helicoidală, un pas al elicei cuprinzând 5-6 resturi glucozil.



Amilopectina are o structură ramificată arborescentă, cu ramificații alcătuite din 24-30 resturi de glucoză unite prin legături glicozidice α -(1 $\rightarrow$ 4) în catenă și prin legături glicozidice α -(1 $\rightarrow$ 6) la punctele de ramificație.



Există o serie de enzime care acționează asupra amidonului, cu ajutorul cărora s-au putut evidenția diferențele structurale ale celor două componente ale amidonului:

- **α -amilaza** este o metaloenzimă (salivară și pancreatică) care hidrolizează legăturile α -(1 $\rightarrow$ 4) din interiorul lanțurilor;
- **β -amilaza** este enzima care acționează prin scindarea legăturilor α -(1 $\rightarrow$ 4) începând de la extremitatea nereducătoare a lanțului poliglucidic, cu eliberarea succesivă de unități de maltoză;
- **α -1-6-glucozidaza** este o enzimă de deramificare care catalizează scindarea legăturilor α -(1 $\rightarrow$ 6) ale amilopectinei;
- **maltaza** acționează asupra maltozei pe care o scindează în două molecule de glucoză.

În urma hidrolizei enzimatic totale a amidonului la nivelul tubului digestiv rezultă molecule de glucoză care sunt absorbite prin peretele intestinal.

Glicogenul este echivalentul animal al amidonului și reprezintă forma de depozitare a excesului de glucoză în mușchi și ficat. Sinteza glicogenului are loc în mușchi și ficat în procesul de **glicogenogeneză**. Din punct de vedere structural, glicogenul este similar amilopectinei, doar că este mai ramificat, având catene alcătuite din 12-14 resturi de glucoză unite prin legături glicozidice α -(1 $\rightarrow$ 4) cu legături glicozidice α -(1 $\rightarrow$ 6) la punctele de ramificație.

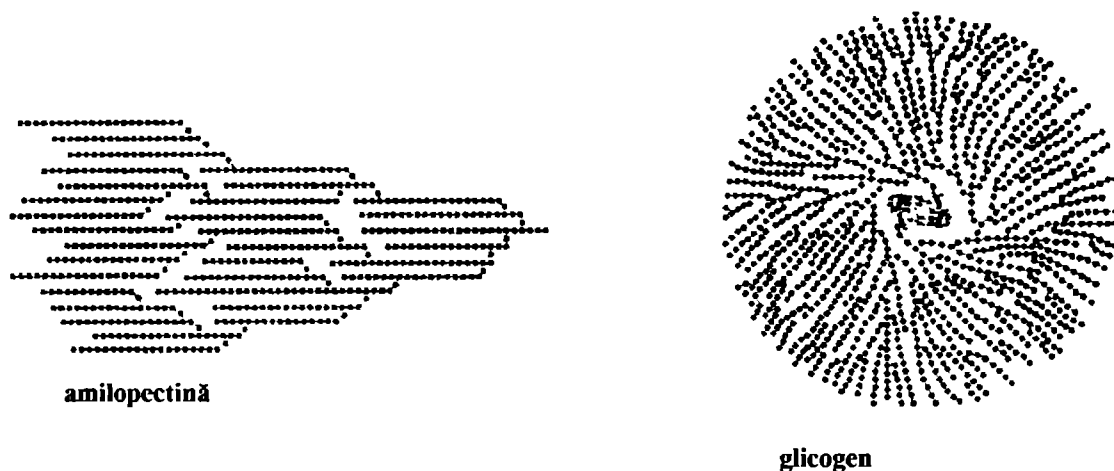
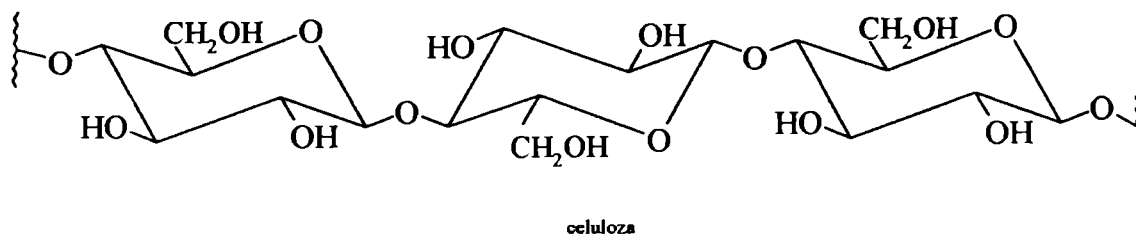


Fig. 7.3. Comparație între modul de ramificare din amilopectină și glicogen

La nivelul celulei hepatice, glicogenul ocupă un spațiu cât mai restrâns, prin faptul că structura sa arborescentă se încadrează într-o sferă în care coexistă legăturile α -(1 $\rightarrow$ 4) și α -(1 $\rightarrow$ 6). În țesuturile animale, glicogenul nu este scindat până la moleculele de glucoză printr-o simplă reacție enzimatică de hidroliză ca în cazul digestiei amidonului, ci printr-un proces de **fosforilare**, preoces catalizat de **fosforilaze (a și b)**, care scindează legăturile α -(1 $\rightarrow$ 4), fosforilând în același timp resturile de glucoză în poziția 1. Legăturile α -(1 $\rightarrow$ 6) sunt scindate enzimatic de amilo-1-6-glucozidază. Prin acțiunea conjugată a acestor enzime, glicogenul este fragmentat până la glucoză, care fie este folosită în procesele energetice, fie trece în sânge pentru menținerea constantă a nivelului glicemiei.

Celuloza este un important polizaharid de origine vegetală, reprezentând constituentul principal al pereților celulari ai plantelor, cu rol structural și de susținere. Celuloza are o structură liniară neramificată formată din 2000-10000 resturi de β -glucopiranoză unite prin legături glicozidice β -(1 $\rightarrow$ 4). Unitatea structurală repetitivă a celulozei este celobioza.



Celuloza este alcătuită din lanțuri filiforme dispuse paralel, stabilizate prin legături de hidrogen, care conferă acestui edificiu macromolecular o rezistență mecanică deosebită. Nu are valoare alimentară și deci nici energetică, datorită faptului că în organismul uman nu există sisteme enzimatice care să desfacă legăturile β -glicozidice. Flora microbiană din intestinul gros are o capacitate limitată de a hidroliza celuloza. Cel mai important rol fiziologic al celulozei pentru organismul uman este participarea acesteia la motilitatea intestinală.

Inulina este un polizaharid de rezervă care se găsește în tuberculii și rădăcinile de dalie, cicoare, anghinare, păpădie. Este alcătuită din resturi de β -D-fructofuranoză unite prin legături β -(1 $\rightarrow$ 2). Inulina introdusă în organismul uman se elimină ca atare, nefiind metabolizată. Din acest motiv este utilizată ca test pentru exploatarea filtratului glomerular, deoarece după filtrarea ei la nivelul glomerulului renal nu este resorbită de tubii uriniferi.

Dextranii sunt formați din resturi de α -D-glucopiranoză unite prin legături glicozidice α -(1 $\rightarrow$ 6). Datorită proprietăților lor speciale, sunt utilizați ca înlocuitori de plasmă sangvină. Dextranii formează soluții coloidale cu o vâscozitate și presiune osmotică asemănătoare plasmei, în același timp nefiind metabolizați datorită lipsei unei enzime care să hidrolizeze legăturile glicozidice α -(1 $\rightarrow$ 6). Menținerea lor în circulația sangvină până la refacerea proteinelor proprii organismului, face posibilă restabilirea volumului de lichid circulant.

7.3.2. Heteroglicanii

Heteroglicanii sunt polizaharide neomogene alcătuite din mai multe tipuri de unități structurale, unele putând fi componente neglucidice. Din grupul heteroglicanilor fac parte glicoproteinele,

proteoglicanii, componenta neglucidică fiind de natură proteică. Aceste substanțe au o vâscozitate foarte mare (mucosubstanțe). Diferențele dintre glicoproteine și proteoglicani sunt date de:

- natura ozelor și a derivaților glucidici componenți;
- raportul glucid/proteină;
- tipul de legătură dintre partea glucidică și proteine.

În glicoproteine predomină componenta proteică, pe când în proteoglicani predomină componenta glucidică.

Glicoproteinele

Glicoproteinele (mucoproteinele) sunt heteroproteine în care componenta proteică este predominantă, iar componenta prostetică este reprezentată de substanțe din clasa zaharidelor. Componenta glucidică din glicoproteine prezintă grade variate de complexitate structurală. Unitățile care participă frecvent la alcătuirea grupării prostetice a glicoproteinelor sunt: pentoze (xiloză, arabinoză), hexoze (glucoză, manoză, galactoză), metilpentoză (fucoză), hexozamine (glucozamina, galactozamina), acidul neuraminic, acidul sialic.

Legăturile care se formează între glucide și proteine sunt legături covalente de tip N- sau O-glicozidice și se stabilesc fie prin azotul amidic al asparaginei, fie prin grupările hidroxil ale serinei, treoninei, hidroxilizinei, tirozinei sau hidroxiprolinei. La formarea legăturilor N- sau O-glicozidice participă cu precădere N-acetil-glucozamina și N-acetil-galactozamina.

Glicoproteinele reprezintă un grup de substanțe cu o largă distribuție și o considerabilă semnificație biologică. În organism există un număr impresionant de glicoproteine funcționale solubile, cu cele mai diverse roluri:

- participă în procesul de coagulare a sângelui (trombina, fibrinogenul);
- participă în procesele de apărare ale organismului (imunoglobulinele);
- determină specificitatea de grup sanguin (izoaglutininele, haptoglobinele);
- asigură protecția mucoaselor gastrointestinale, ale aparatului respirator și urogenital față de acțiunea enzimelor proteolitice (glicoproteine submaxilare, gastrice, urinare);
- asigură transportul unor vitamine (factorul intrinsec, care transportă vitamina B₁₂), hormoni, metale (ceruloplasmina, transportă Cu²⁺).

A doua categorie de glicoproteine, cu roluri biologice diverse, o reprezintă glicoproteinele structurale:

- receptorii hormonal (glicoproteine membranare capabile să recunoască și să lege un hormon);
- glicoforinele, care reprezintă aproximativ 10% din totalul proteinelor membranare eritrocitare.

Proteoglicanii și glicozaminoglicanii

Proteoglicanii sunt biomolecule care prezintă fragmente poliglucidice legate *covalent* sau *electrovalent* de partea proteică a moleculei. Conținutul poliglucidic al proteoglicanilor, cantitativ predominant, variază între 85-90% din masa moleculei. Proteoglicanii sunt specifici organismului animal și uman; se găsesc în cartilaje, tendoane, piele, lichid sinovial și sunt constituenții principali ai substanței fundamentale care umple spațiul dintre celule. Componenta zaharidică a proteoglicanilor este reprezentată de **glicozaminoglicani (mucopolizaharide)**, fiind alcătuită prin condensarea a două tipuri de unități: a) hexozamină (glucozamină sau galactozamină) și b) acid uronic (în general acid β -glucuronic și acid α -iduronic). Grupările aminice ale hexozaminelor sunt frecvent acetilate; unele polizaharide cuprind și resturi sulfat legate esteric sau amidic.

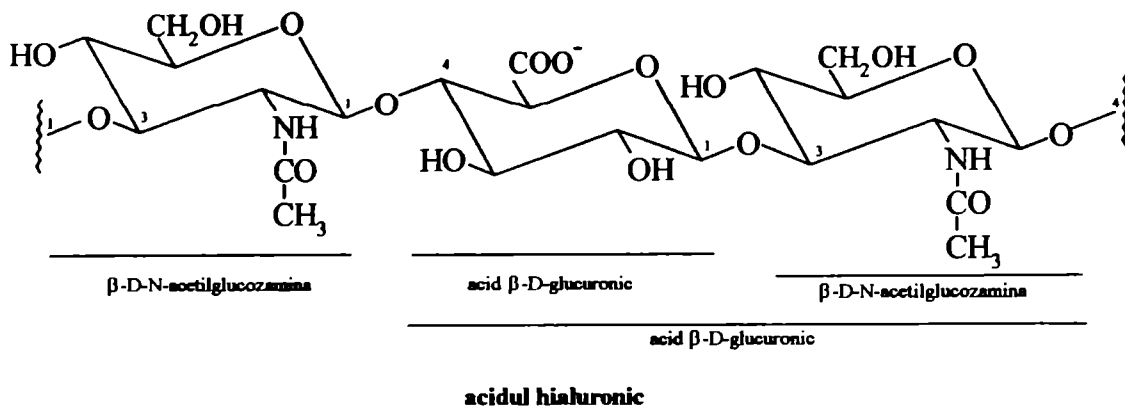
Glicozaminoglicanii au diferențe structurale determinate de natura fragmentelor glucidice, de configurația anomerică și poziția legăturii glicozidice care se stabilesc între unitățile diglucidice, de numărul și localizarea grupărilor sulfat. Sunt cunoscute șapte tipuri de glicozaminoglicani, ale căror caracteristici sunt prezentate în Tabelul 7.3. Datorită numărului mare de anioni carboxilat și sulfat prezenți în moleculă, glicozaminoglicanii se comportă ca niște **polielectroliți anionici**, caracteristică esențială care explică implicarea lor funcțională în fixarea cationilor în organism.

Exceptând acidul hialuronic care formează lanțuri heteropolizaharidice solitare, ceilalți glicozaminoglicani se asociază covalent sau electrovalent cu proteinele. Legătura cu proteinele se stabilește între N-acetilgalactozamină și serină, treonină sau asparagină.

Caracterul polianionic și hidrofil puternic determină proteoglicanii să lege mari cantități de apă, ceea ce face ca acești să ocupe un volum mare. Această organizare difuză și hidratată a moleculelor formează goluri care facilitează migrarea moleculelor solubile în apă în mediul extracelular.

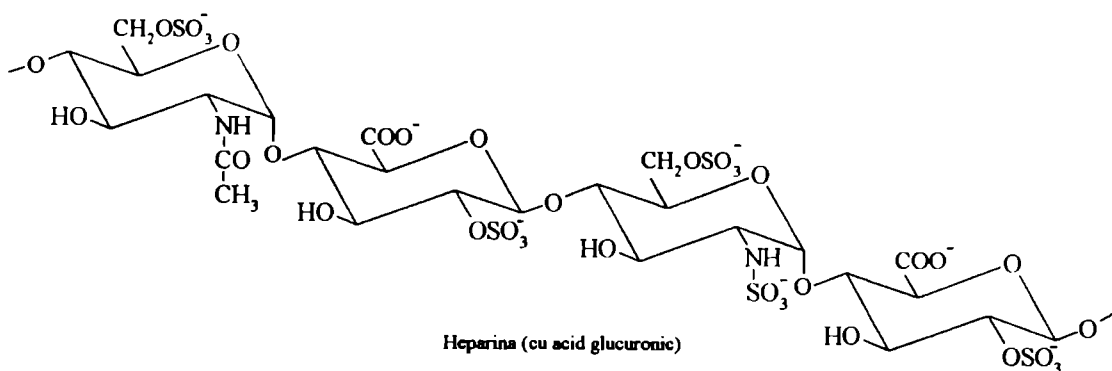
Acidul hialuronic

Acidul hialuronic este singurul glicozaminoglican nesulfat și se găsește localizat în substanța fundamentală a țesutului conjunctiv, piele, corpul vitros, cartilagii, lichid sinovial. Îndeplinește rolul de **liant tisular**, acționând ca un ciment intracelular. Acidul hialuronic nu este legat de o moleculă proteică, dar formează structuri de molecule „gigant” prin asamblarea cu proteoglicani care conțin predominant condroitin sulfatul. Este un polimer liniar cu masă moleculară mare, compus din acid D-glucuronic și N-glucozamină, care se leagă alternativ prin legături glicozidice β -(1 $\rightarrow$ 3) și β -(1 $\rightarrow$ 4), unitatea dizaharidică fiind **acidul hialobiuronic**.

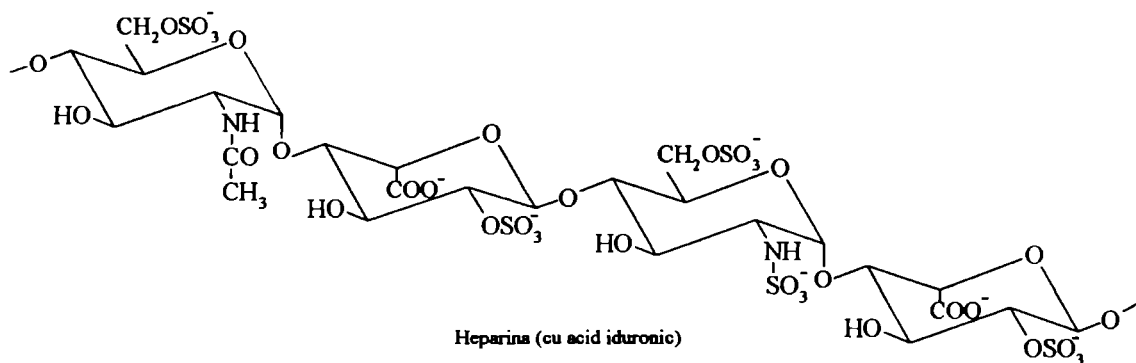


Acidul hialuronic poate fi scindat hidrolitic de enzima **hialuronidază** prezentă în bacterii, veninul unor șerpi și spermatozoizi. Hialuronidaza prezentă în capul spermatozoizilor depolimerizează stratul de acid hialuronic care înconjoară ovulul; astfel, permeabilitatea ovulului se mărește, ceea ce facilitează fecundarea sa prin penetrarea spermatozoidului. Hialuronidaza bacteriană desface hidrolitic acidul hialuronic din țesutul conjunctiv, ceea ce determină diminuarea capacității de filtru selectiv a substanței fundamentale și în consecință expunerea țesuturilor la invazia toxinelor bacteriene în organism.

Heparina. Heparina este un glicozaminoglican identificat în ficat, plămân, miocard, de unde se poate izola. Are acțiune anticoagulantă și este activator al enzimei lipoproteinlipaza. Unitățile diglucidice ale heparinei prezintă o heterogenitate atât a restului de acid uronic (care poate fi acid glucuronic sau iduronic sulfatat) cât și a glicozaminei (care poate fi N-acetilată sau N-sulfată). O structură posibilă a heparinei conține acid β -glucuronic și glucozamină sulfonată la N și C-6:



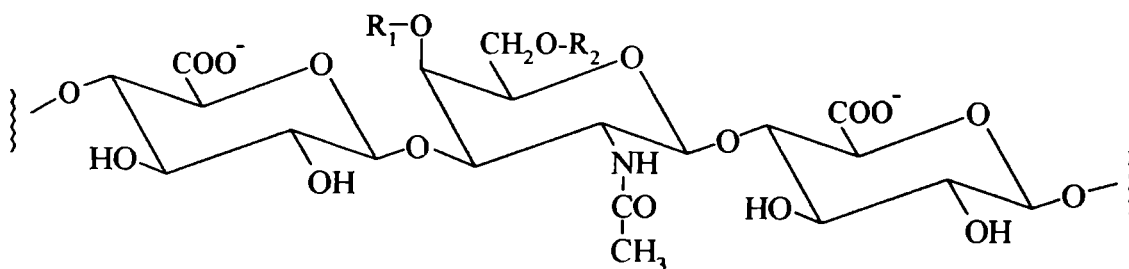
O altă structură a heparinei diferă de prima prin prezența acidului iduronic în locul acidului glucuronic.



Acțiunea anticoagulantă a heparinei se bazează pe proprietatea sa de a forma un complex inactiv cu trombokinaza care intervine în reacția de transformare a protrombinei în trombină. Heparina deține un rol important și în procesul de limpezire a plasmei prin acțiunea de eliberare și activare a lipoproteinlipazei care acționează asupra chilomicronilor și lipoproteinelor cu densitate foarte mică (VLDL).

Condroitinsulfații

Condroitinsulfații sunt glicozaminoglicani majori din proteinglicanii cartilagiilor, tendoanelor, arterelor; țesutul nediferențiat cicatricial cuprinde de asemenea mari cantități de condroitinsulfați. Condroitinsulfații sunt constituiți din resturi de acid glucuronic care alternează cu resturi de N-acetilgalactozamină cu o grupare ester sulfuric la C-4 sau C-6.



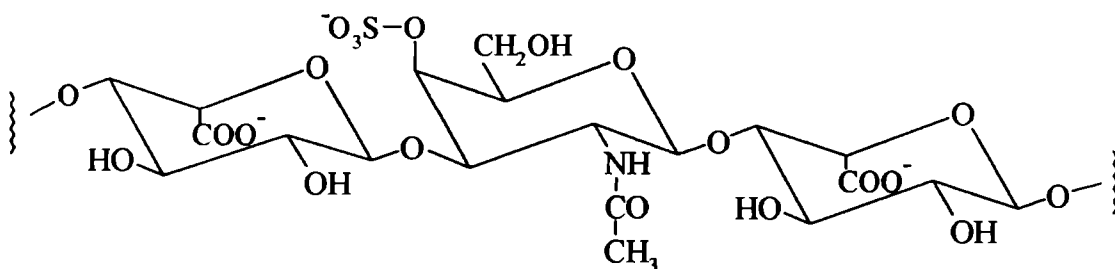
Structura condroitinsulfatului A ($R_1 = \text{SO}_3^-$, $R_2 = \text{H}$) și
a condroitinsulfatului C ($R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{SO}_3^-$)

Condroitinsulfații au rol de susținere în timpul elaborării structurii fibrilare a collagenului. Datorită numărului mare de sarcini electrice negative, condroitinsulfații au capacitatea de a fixa ionii de Ca^{2+} , ceea ce le conferă un rol important în reglarea homeostaziei matricei cartilajului și în mineralizarea matricei osoase.

Proteoglicanii conținând condroitinsulfați se asociază prin intermediul unor proteine de legare cu acidul hialuronic, care apare ca o coloană vertebrală, formând agregate supramoleculare de dimensiuni foarte mari (cca 100 molecule de proteoglicani/moleculă de acid hialuronic). În cursul evoluției biologice a unui individ, nivelul cantitativ al condroitinsulfaților scade cu vârsta.

Dermatan sulfatul (considerat până nu de mult condroitinsulfatul B) însoțește condroitinsulfații în cartilaje, vase, tendoane. Structural este asemănător cu condroitinsulfatul A, cu deosebire că în locul acidului gluconic apare acidul iduronic. Particularitatea biologică importantă este că nivelul său tisular crește cu vârsta.

O excreție urinară crescută a dermatan sulfatului se observă în boala lui Hurler, caracterizată prin infiltrație lipidică în țesuturi și organe (ficat, splină, cornee) și tulburări psihice. Boala se instalează la 3-4 luni de viață și subiectul nu depășește 20 de ani; cauza decesului este insuficiența circulatorie ca urmare a acumulării dermatan sulfatului.



Structura dermatan sulfatului

Keratan sulfatul are o structură analogă cu a celorlalți glicozaminoglicani, deosebindu-se de aceștia prin absența acizilor uronici care sunt substituiți cu grupări galactozil. Keratan sulfatul este absent la naștere, crește până la vârsta de 30 de ani, pentru ca apoi să rămână la un nivel stabil până la vârsta de 80 de ani. Variației cu vârsta a keratan sulfatului și condroitinsulfaților i s-a acordat o atenție deosebită în studiul procesului de îmbătrânire.

8. Lipide

Lipidele constituie un grup eterogen de compuși, care include grăsimile, uleiurile, steroizii, cerurile și alți compuși înrudiți. Acești compuși au în comun două proprietăți fizice: sunt **insolubile în apă** și sunt **solubile în solvenți nepolari**, cum ar fi eterii sau cloroformul. Lipidele sunt constituenți de bază ai alimentației nu numai datorită faptului ca sunt surse bogate de energie, dar și datorită faptului că grăsimile din alimentația naturală conțin vitamine liposolubile sau acizi grași esențiali. Grăsimile sunt stocate în **țesuturile adipoase**, unde joacă și rol de izolatori termici în țesuturile subcutanate sau în jurul anumitor organe. Lipidele nepolare joacă rol de **izolatori electrici**, permițând propagarea rapidă a undelor de depolarizare de-a lungul **nervilor mielinici**. Combinațiile dintre lipide și proteine (**lipoproteinele**) sunt constituenți celulari importanți ai **membranele celulare** și intracelulare, având și rolul de a **transporta lipide în sânge**. Cunoașterea biochimiei lipidelor este necesară pentru înțelegerea multor aspecte biomedicale, cum ar fi **obezitatea, diabetul zaharat, ateroscleroza** și pentru elucidarea rolului diferiților **acizi grași nesaturați** în nutriție și în menținerea stării de sănătate.

8.1. Clasificarea lipidelor

Lipidele se împart în două mari categorii: lipide simple și lipide complexe.

1. Lipidele simple sunt esteri ai acizilor grași cu diferiți alcooli. Există două clase de lipide simple:

- a. **Acilglicerolii** sau **grăsimile** sunt esteri ai acizilor grași cu glicerolul. **Uleiurile** sunt grăsimi în stare lichidă.
- b. **Cerurile** sunt esteri ai acizilor grași cu alcooli alifatici monohidroxicici superiori („alcooli grași”).
- c. **Steridele** sunt esteri ai unor alcooli policiclici superiori (steroli) cu acizi grași.

2. Lipidele complexe sunt esteri ai acizilor grași cu glicerolul sau amide ale acizilor grași cu sfingozina, care mai conțin în structura lor acid fosforic, alcooli cu azot (serina, colamina, colina), inozitol, glucide. Lipidele complexe pot fi clasificate în trei subgrupe:

- a. **Fosfolipidele** sunt lipide care conțin pe lângă acizi grași și un alcool, un rest de acid fosforic. Fosfolipidele pot fi **glicerofosfolipide** (alcoolul este glicerolul), **sfingofosfolipide** (alcoolul este sfingozina), etc.
- b. **Glicolipidele** (**glicosfingolipide**) sunt lipide care conțin un acid gras, sfingozină și un carbohidrat.
- c. **Alte lipide complexe** includ lipide cum ar fi sulfolipidele și aminolipidele. Lipoproteinele pot fi și ele incluse în această categorie.

3. Precursorii și derivații lipidelor includ acizii grași, glicerolul, steroizii, alcoolii grași, aldehydele grase, corpii cetonici, hidrocarburi, vitaminele liposolubile, unii hormoni.

Acilglicerolii (gliceridele), colesterolul și esterii de colesterol sunt **lipide neutre**, nefiind încărcate electric.

8.2. Roluri biologice ale lipidelor

Lipidele îndeplinesc următoarele roluri de prim ordin pentru organismul uman și animal:

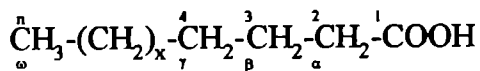
- constituie o **importantă sursă de energie** pentru organism; prin metabolizare, 1 g lipide eliberează în medie 9,3 calorii, superior glucidelor, care în aceleași condiții eliberează 4,1 calorii;
- în asociație cu proteinele sunt **constituenți structurali ai membranelor celulare** și **intracelulare** intervenind în reglarea permeabilității, respectiv a transportului prin biomembrane;
- în lichidele biologice funcționează ca **sistem de transport** pentru unele substanțe nepolare liposolubile (vitamine, hormoni);
- reprezintă **forma de depozitare** a rezervelor energetice ale organismului animal și uman, în special în țesutul adipos;
- au rol de **material izolant** de protecție mecanică și termică a unor organe și a întregului corp;
- datorită sarcinii electrice a unor lipide acestea participă în **transmiterea impulsului** de-a lungul fibrei nervoase.

8.3. Acizi grași

Acizii grași se întâlnesc în special sub formă de esterii în grăsimile și uleiurile naturale, dar există și în formă neesterificată, sub formă de **acizi grași liberi**, formă în care sunt transportați prin plasma sanguină. Acizii grași care se întâlnesc în grăsimile naturale sunt acizi monocarboxilici, de regulă cu catenă liniară și cu număr par de atomi de carbon, deoarece sunt biosintetizați prin adăugări succesive de grupări acetyl (din acetylCoA). Acizii grași pot fi **saturați** (catena lor nu conține legături duble) sau **nesaturați** (catena lor conține una sau mai multe legături duble).

În mod sistematic, acizii grași sunt denumiți pornind de la numele hidrocarburii de la care provin în mod formal, prin adăugarea sufixului **-oic**. Astfel, acidul gras saturat cu 8 atomi de carbon este acidul octanoic, cu 10 atomi de carbon este acidul decanoic, etc.

Atomii de carbon din acizii carboxilici sunt numerotați începând cu carbonul din gruparea carboxil (C-1). Atomii de carbon adiacenți grupării carboxil pot fi desemnați utilizând litere grecești, astfel încât C-2, C-3, C-4 sunt atomii de carbon α , β , respectiv γ ; carbonul din metilul terminal este notat convențional n sau ω .



În unele convenții se utilizează Δ pentru a indica numărul și poziția dublelor legături: de exemplu, Δ^9 indică existența unei duble legături între C-9 și C-10; $\omega 9$ indică existența unei duble legături la al nouălea atom de carbon, numărând de la C- ω .



sau



Acidul oleic (acidul 9-octadecenoic). n-9 este echivalent cu $\omega 9$

La animale, legăturile duble adiționale pot fi introduse numai între dubla legătură preexistentă ($\omega 9$, $\omega 6$ sau $\omega 3$) și gruparea caboxil, ceea ce duce la existența a trei serii de acizi grași nesaturați, cunoscute sub numele de familiile $\omega 9$, $\omega 6$ și respectiv $\omega 3$.

8.3.1. Acizi grași saturați

Acizii grași saturați au origine endogenă și exogenă și au formula generală $\text{C}_n\text{H}_{2n}\text{O}_2$ sau $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_x\text{COOH}$, unde $n = 4-30$. În tabelul 8.1 sunt prezentați principalii acizi grași saturați cu importante roluri biologice pentru organismul animal și uman. Pentru organismul uman, cei mai importanți sunt acizii grași care au între 14-24 atomi de carbon. Acizii inferiori C_4-C_{10} se găsesc din abundență în grăsimile din laptele rumegătoarelor, fiind foarte importante din punct de vedere nutrițional pentru organismul uman. Acizii superiori se găsesc în special în ceruri.

Sub formă de constituenți ai lipidelor, acizii grași saturați se află distribuiți în diverse țesuturi animale și produse naturale cu rol alimentar. De importanță majoră pentru organismul uman și cu cea mai largă răspândire sunt acizii palmitic, stearic și lignoceric.

Tablul 8.1. Acizi grași saturați

Denumire uzuală	Denumire sistematică	Atomi C	Caracteristici
Acid acetic	Acid etanoic	2	Produs final major al fermentației carbohidraților la rumegătoare; se formează în cantitate mică și în colonul uman
Acid butiric	Acid butanoic	4	Se găsesc în cantități mici în anumite grăsimi, în special în unt. Produs final al fermentației carbohidraților la rumegătoare
Acid caproic	Acid hexanoic	6	
Acid caprilic	Acid octanoic	8	
Acid capric	Acid decanoic	10	
Acid lauric	Acid dodecanoic	12	Spermanțet, scorțișoară, uleiul de palmier, uleiul de cocos, dafin, unt
Acid miristic	Acid tetradecanoic	14	Nucșoară, uleiul de palmier, uleiul de cocos, mirt, unt
Acid palmitic	Acid hexadecanoic	16	Comuni în toate grăsimile animale și vegetale
Acid stearic	Acid octadecanoic	18	

8.3.2. Acizi grași nesaturați

Acizii grași nesaturați reprezintă circa 75% din totalul acizilor grași constituenți ai lipidelor de origine animală și vegetală. Conțin una sau mai multe legături duble (Tabelul 8.2) și pot fi clasificați după cum urmează:

- 1) **Mononesaturați** (acizi monoenoici), conțin o singură legătură dublă.
- 2) **Polinesaturați** (acizi polienoici), conțin două sau mai multe legături duble.
- 3) **Eicosanoizi**. Acești compuși derivă de la acizi eicosa- (20 atomi de carbon)-polienoici și includ **prostanoidele**, **leucotrienele (LT)**, și **lipoxinele (LX)**. Prostanoidele includ **prostaglandinele (PG)**, **prostacilinele (PGI)** și **tromboxanii (TX)**.

Cei mai importanți din punct de vedere biologic pentru organismul uman sunt acizii grași nesaturați cu 18, 20 sau 24 atomi de carbon, având una, două, trei sau patru duble legături.

Prezența în moleculă a dublelor legături conferă acizilor grași o **izomerie geometrică** și deci existența a doi izomeri *cis* și *trans*. În lipidele naturale predomină configurația *cis*. Catena de carbon a acizilor grași saturați are o conformație în zigzag la temperaturi joase. La temperaturi ridicate, unele legături se rotesc ducând la îndoirea și scurtarea catenei, ceea ce explică de ce biomembranele se subțiază cu creșterea temperaturii. Conformația spațială a izomerilor *trans* ai acizilor grași prezintă o similitudine cu aceea a acizilor grași saturați.

Tabelul 8.2. Acizi grași nesaturați cu importanță fiziologică și nutrițională.

Nr. atomilor de C și poziția dublelor legături	Familia	Denumire uzuală	Denumire sistematică	Răspândire
Acizi monoenoici (o sigură legătură dublă)				
16:1;9	ω 7	Palmitoleic	<i>cis</i> -9-hexadecenoic	În aproape toate grăsimile
18:1;9	ω 9	Oleic	<i>cis</i> -9-octadecenoic	Probabil cel mai răspândit dintre acizii grași
18:1;9	ω 9	Elaidic	<i>trans</i> -9-octadecenoic	Grăsimile rumegătoarelor și cele hidrogenate
Acizi dienoici (două legături duble)				
18:2;9,12	ω 6	Linoleic	all- <i>cis</i> -9,12-octadecadienoic	Porumb, alune, semințe de bumbac, plante oleifere
Acizi trienoici (trei legături duble)				
18:3;6,9,12	ω 6	γ -Linolenic	all- <i>cis</i> -6,9,12-octadecatrienoic	Unele plante
18:3;9,12,15	ω 3	α -Linolenic	all- <i>cis</i> -9,12,15-octadecatrienoic	Însoțește acidul linoleic, uleiul de in
Acizi tetraenoici (patru legături duble)				
20:4;5,8,11,14	ω 6	Arahidonic	all- <i>cis</i> -5,8,11,14-eicosatetraenoic	În grăsimile animale și uleiul de arahide; componentă importantă a fosfolipidelor
Acizi pentaenoici (cinci legături duble)				
20:5;5,8,11,14,17	ω 3	Timnodonic	all- <i>cis</i> -5,8,11,14,17-eicosapentaenoic	Componentă importantă a uleiurilor de pește (din ficat de cod, macrou, somon)
Acizi hexaenoici (șase legături duble)				
22:6;4,7,10,13,16,19	ω 3	Cervonic	all- <i>cis</i> -4,7,10,13,16,19-docosahexaenoic	Uleiuri de pește, fosfolipidele din creier

Configurația *cis*, prezentă în majoritatea acizilor grași nesaturați care se găsesc în natură, face ca molecula să prezinte o „îndoitură” de 120° la nivelul dublei legături. Astfel, acidul oleic are o formă de L, în timp ce izomrul său *trans*, acidul elaidic, are o configurație liniară.

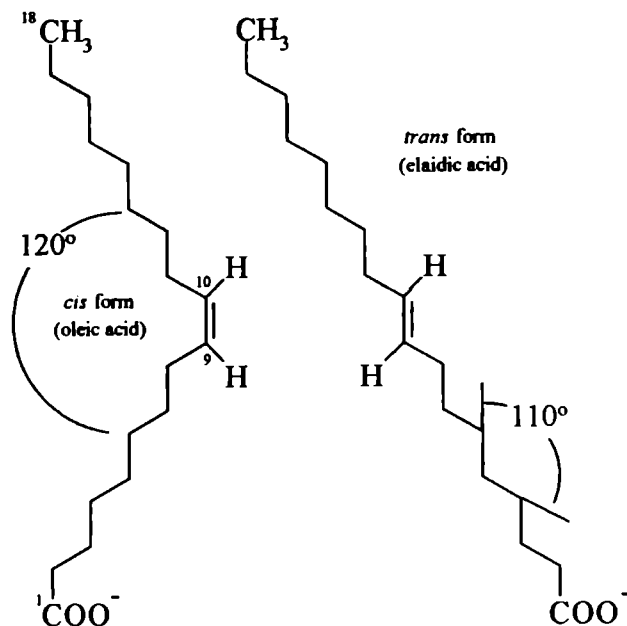


Figura 8.1. Influența configurației unei legături duble (*cis* sau *trans*) asupra geometriei catenei unui acid gras nesaturat.

Creșterea numărului de legături duble *cis* în molecula unui acid gras duce la o mulțime de posibilități privind configurațiile spațiale ale moleculei. Acidul arahidonic, de exemplu, are patru legături duble și o moleculă în formă de U. Acest lucru influențează împachetarea moleculară a lipidelor în structura membranelor celulare, ca și poziția pe care acizii grași o ocupă în moleculele mai complexe, de tipul fosfolipidelor. Prezența legăturile duble *trans* modifică aceste relații spațiale. Acizii grași *trans* se găsesc în unele alimente, fiind și produși secundari în procesele de hidrogenare a acizilor grași nesaturați sau de „întărire” a uleiurilor vegetale la obținerea margarinei.

Proprietățile fizice și fiziologice ale acizilor grași sunt determinate de lungimea catenei și de gradul lor de nesaturare. Punctele de topire a acizilor grași cresc cu lungimea catenei și scad cu creșterea gradului de nesaturare. Un triacilglicerol care conține în structura sa trei resturi acil saturate cu catene de 12 atomi de carbon sau mai mari, va fi solid la temperatura organismului, față de un triacilglicerol în care resturile acil sunt 18:2, și care este lichid la 0°C . Triacilglicerolii naturali conțin resturi acil diferite, în funcție de rolurile pe care ele le joacă în organism. Lipidele membranare, care trebuie să fie fluide la toate temperaturile fiziologice, au un grad de nesaturare mai mare decât lipidele de depozit. Lipidele din țesuturile care sunt expuse la temperaturi joase (de exemplu țesuturile din extremități) au un grad mai mare de nesaturare.

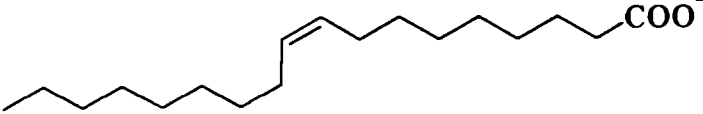
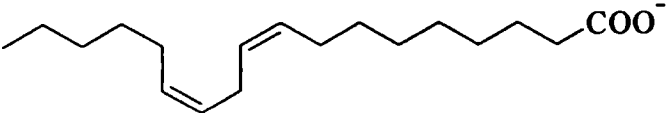
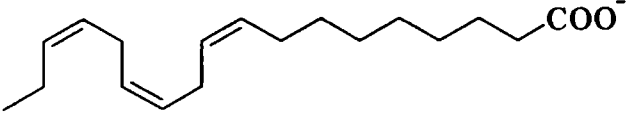
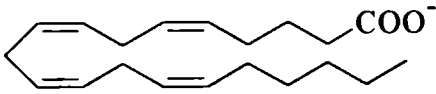
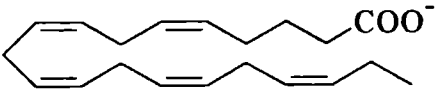
	Punct de topire (°C)
 acid oleic	13
 acid linoleic	- 5
 acid linolenic	- 11
 acid arahidonic	- 50
 EPA	- 50

Figura 8.2. Influența gradului de nesaturare asupra geometriei moleculelor de acizi grași reflectată în variația punctelor de topire.

8.4. Prostaglandine. Eicosanoizi.

Prostaglandinele există practic în toate țesuturile mamiferelor, având rol de hormoni locali cu activități fiziologice și farmacologice importante. Sunt sintetizate *in vivo* prin ciclizarea centrului catenei hidrocarbonate a acizilor grași polinesaturați cu 20 atomi de carbon (de exemplu acidul arahidonic) cu formarea unui inel ciclopentanic. Toate țesuturile mamiferelor sintetizează prostaglandine ca răspuns la diverși stimuli, ele fiind implicate în fiziopatologia multor procese fundamentale ca vasomotricitatea, procesele inflamatorii, tromboza, secreția gastrică, reproducerea, anticoncepția, funcția renală, transmitia impulsului nervos, respirația, metabolismul intermediar.

Prostaglandinele și alte clase de compuși înrudiți au ca element comun filiația la acizi grași nesaturați polienici cu 20 atomi de carbon (acid arahidonic, acid eicosapentaenoic, acid dihomi γ-linolenic), fiind denumite generic **eicosanoizi** (de la alcanul $C_{20}H_{42}$ = eicosan). Eicosanoizii pot fi clasificați în:

- 1) **ciclici** (prostanoizi):

- prostaglandine (Pg)
- tromboxan (Tx)
- prostaciclina

2) **aciclici:**

- leucotriene simple sau peptidice (LT)
- lipoxine
- acizi grași hidroxiilați (HPETE, HETE).

Acidul arahidonic este precursorul comun al prostaglandinelor și leucotrienelor. Producții sintetizați sub acțiunea enzimei **prostaglandin ciclooxygenaza** se numesc **prostanoizi**, iar cei rezultați sub acțiunea enzimei **lipoxigenaza** se numesc **derivați lipoxigenazici** (leucotriene, lipoxine, acizi grași hidroxiilați).

Prostaglandinele sunt compuși majoritari în clasa eicosanoizilor și reprezintă o categorie de acizi grași polinesaturați care derivă de la ipoteticul acid prostanoic. Caracteristic structurii prostaglandinelor naturale este un ciclu pentanic pe care sunt grefate două catene inegale cu 7 și respectiv 8 atomi de carbon. La C1 există o grupare carboxilică, iar la C15 există o grupare hidroxiilică. Diversele prostaglandine naturale se deosebesc prin natura substituenților din pozițiile 9 și 11 și de existența unei duble legături în ciclul pentanic, alcătuind 9 serii simbolizate A-I.

Notăția prostaglandinelor s-a făcut în momentul descoperirii lor, înaintea stabilirii structurii lor chimice. Prostaglandina E a fost de exemplu izolată dintr-o fază **eterică**, prostaglandina F prin extracție cu tampon **fosfat**, iar prostaglandinele A și B s-au obținut din E prin tratare cu **acizi** și respectiv **baze**. Cele șase prostaglandine din grupele E și F, descoperite primele, au fost denumite **prostaglandine primare**, iar cele derivând de la acestea **prostaglandine secundare**.

În raport cu numărul de duble legături catenare, la simbolul seriei se adaugă următorii indici:

- 1, pentru o legătură dublă *trans* C₁₃-C₁₄
- 2, pentru o legătură dublă *trans* C₁₃-C₁₄ și una *cis* C₅-C₆
- 3, pentru o legătură dublă *trans* C₁₃-C₁₄, una *cis* C₅-C₆ și încă una *cis* C₁₇-C₁₈.

Pentru substituenții ciclului pentanic se utilizează simbolurile α pentru cei aflați sub planul imaginii grafice (cu reprezentare prin linie punctată) și β pentru cei aflați deasupra planului (cu reprezentare prin linie continuă).

Dintre prostaglandinele primare la om, cele mai importante sunt PGE₂ (acidul 11,15S-dihidroxi-9-ceto-5*cis*,15*trans*-prostadienoic) și PGF_{2 α} (acidul 9,11,15S-trihidroxi-5*cis*,13*trans*-prostadienoic).

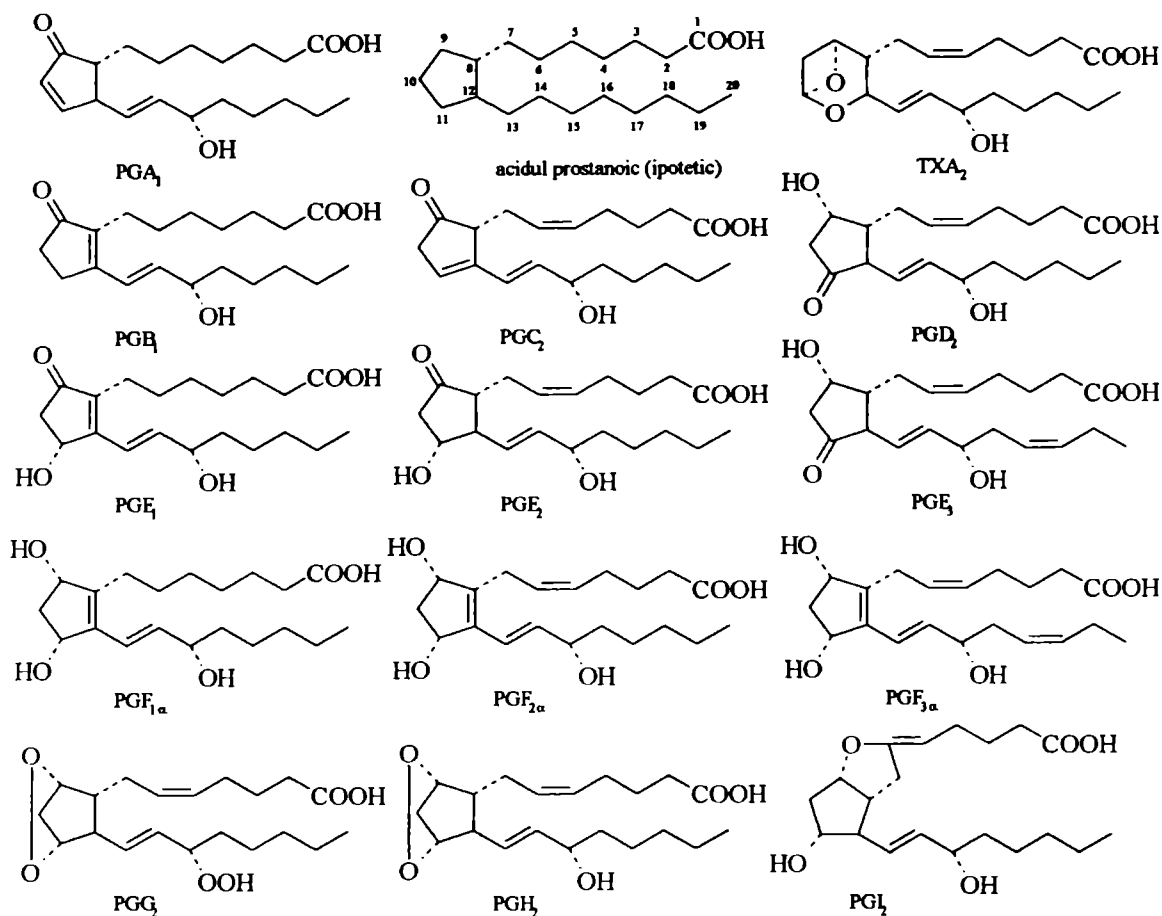
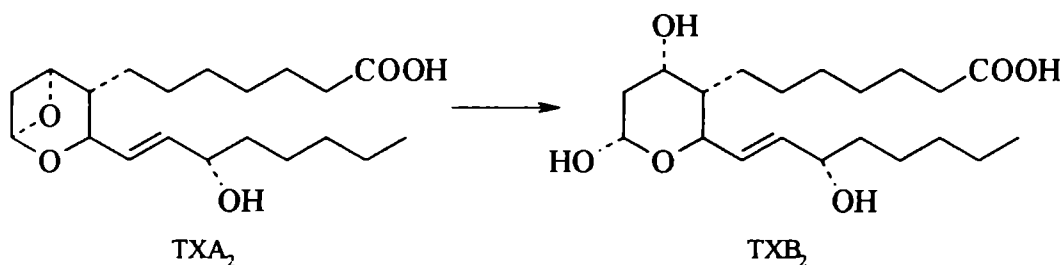


Figura 8.3. Principalele serii de prostaglandine naturale.

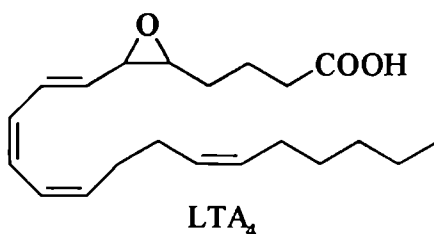
Tromboxanii cuprind un heterociclu piranic, (formal, ca și cum inelul ciclopentanic din prostaglandine ar include un atom de oxigen). TXA_2 este foarte instabil datorită punții eterice, trecând ușor în TXB_2 :



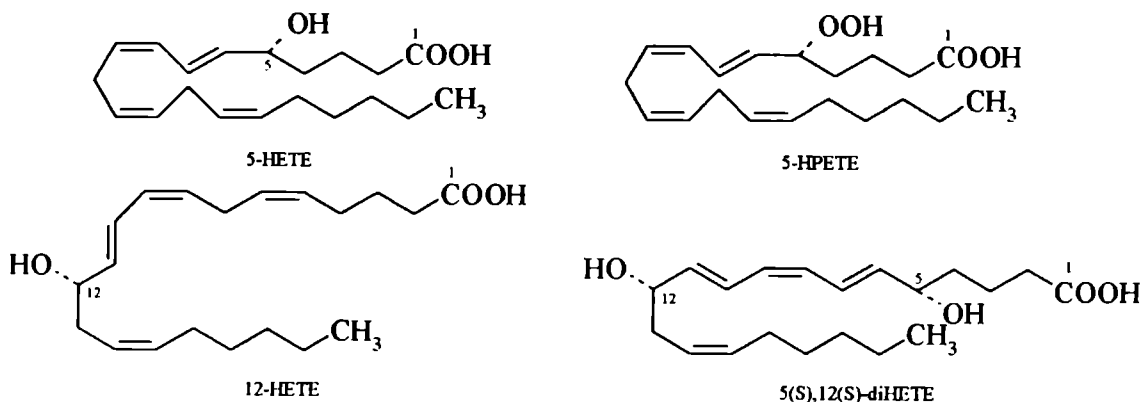
Postaciclina (PGI_2 , vezi formula în Figura 8.3) se sintetizează în organism ca rezultat al acțiunii enzimei prostaciclinsintetaza asupra unor endoperoxizi proveniți din acidul arahidonic. Această enzimă

este prezentă în peretele vascular din rețeaua care irigă multe organe. PGI_2 este un produs instabil, dar cu puternice proprietăți antiagregatoare.

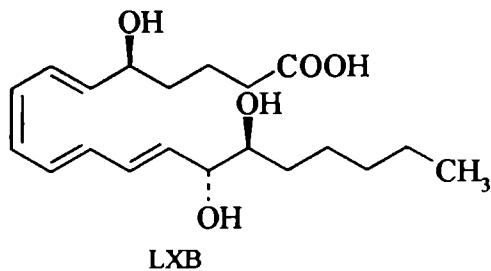
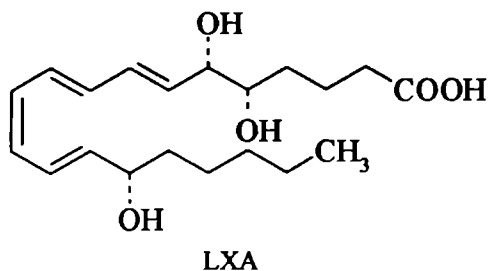
Leucotrienele sunt derivați oxigenați neciclici ai acizilor grași superiori cu 20 atomi de carbon având 3, 4 sau 5 duble legături, dintre care cel mai important este acidul arahidonic. Leucotrienele se pot clasifica în **leucotriene simple** nepeptidice și **leucotriene peptidice**, acestea din urmă fiind legate de o **tiopeptidă** (glutathionil-cisteinil-glicină). Sunt simbolizate prin majuscule (de la A la F), fiecare majusculă fiind urmată de o cifră care reprezintă numărul dublelor legături din moleculă.



Leucotrienele provoacă bronhoconstricția, fiind în același timp agenți inflamatori puternici, cu rol în inducerea astmului. Precursorii imediați ai leucotrienele sunt acizii **hidroxieicosatetraenoici (HETE)** sau **hidroxiperoxieicosatetraenoici (HPETE)** rezultați prin oxidarea acidului arahidonic sub influența lipoxigenazei.

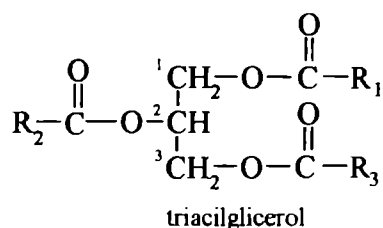


În neutrofilele de om s-a descoperit o enzimă care produce din 5-HPETE o nouă categorie de acizi grași tetraenoici hidroxilați care au fost denumite **lipoxine (LX)**. Aceste substanțe din grupul acizilor polihidroxilați s-au dovedit active biologic, stimulând degradarea neutrofilelor.

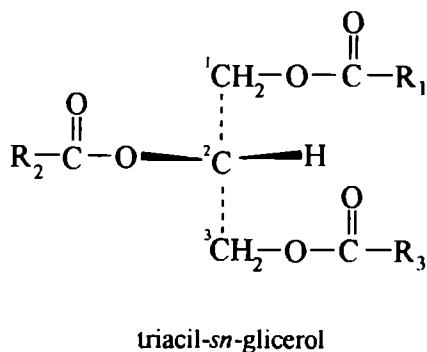


8.5. Triglicilglicerolii (trigliceridele)

Triacilglicerolii sunt esteri ai glicerolului cu acizi grași și reprezintă forma principală de stocare a energiei în organism. Conform terminologiei standard stabilite de Uniunea Internațională de Chimie Pură și Aplicată (IUPAC) și de Uniunea Internațională de Biochimie (IUB), monogliceridele, digliceridele și trigliceridele trebuiesc denumite monoacilgliceroli, diacilgliceroli și respectiv triacilgliceroli. Cu toate acestea, terminologia veche de „gliceride” este încă des utilizată, în special în practica medicală. Mono- și diacilglicerolii sunt intermediari în cursul sintezei și degradării triacilglicerolilor și se găsesc în țesuturi în cantități foarte mici.



Atomii de carbon C-1 și C-3 din glicerol nu sunt identici, iar pentru a-i numerota neechivoc, se utilizează sistemul de numerotare stereochemică *sn*-1 și respectiv *sn*-3.



Când sunt priviți tridimensional, atomii de carbon C-1 și C-3 (prezențați mai sus în proiecție bidimensională) sunt diferiți. Acest lucru este bine sesizat de enzime, ele acționând specific fie la C-1, fie la C-3. De exemplu, glicerolul este întotdeauna fosforilat la *sn*-3 de către glicerol kinază, cu obținere de glicerol-3-fosfat.

Triacilglicerolii există într-o mare varietate, diferențiindu-se prin natura acizilor grași constituenți, cât și prin combinarea lor diferită în interiorul moleculei. Din acest punct de vedere, triacilglicerolii pot fi **omogeni**, când conțin radicali ai aceluiași acid gras și **eterogeni**, când conțin radicali provenind de la acizi grași diferiți. Triacilglicerolii pot fi considerați **lipide neutre**, deoarece nu conțin în molecula lor o grupare funcțională ionizabilă. Triacilglicerolii din organismul uman au origine endogenă și exogenă. Lipidele de origine alimentară suferă procesul de digestie în porțiunea proximală din ileum și duoden, sub acțiunea combinată a acizilor biliari și a lipazei, conducând la glicerol și acizi grași. După absorbție, triacilglicerolii se sintetizează în celulele epiteliale și se formează **chilomicronii**, care sunt transportați prin vasele limfatice și de aici ajung în sistemul sanguin și apoi în diverse țesuturi și organe, unde sunt antrenați în diverse procese metabolice.

Sinteza endogenă are loc în **țesutul adipos și ficat**, după care sunt transportate prin sânge sub formă de lipoproteide cu densitate foarte mică (VLDL).

Triacilglicerolii reprezintă forma de depozitare a acizilor grași, aceștia fiind principalii componenți **energogeneratori**, prin metabolizarea cărora se obține energia necesară activităților vitale. Depozitarea triacilglicerolilor în țesutul adipos se poate face practic fără limite, ceea ce nu este posibil pentru o altă substanță de depozit, cum ar fi glicogenul.

8.6. Fosfolipide

Fosfolipidele reprezintă principalii constituenți lipidici ai membranelor celulare. Fosfolipidele sunt derivați de la **acizi fosfatidici**, în care gruparea fosfat este esterificată cu gruparea OH a unui alcool specific. Acizii fosfatidici reprezintă un intermediar important în sinteza triacilglicerolilor și a fosfoglicerolilor, fără a fi prezent în cantități mari în țesuturi. Majoritatea fosfolipidelor au un radical acil saturat în poziția *sn*-1 și un radical nesaturat în poziția *sn*-2 a glicerolului.

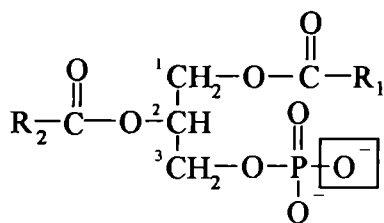
Fosfatidilcolinele (lecitinele) sunt fosfoacilglicerolii care conțin colină. Sunt cele mai abundente fosfolipide din membranele celulare și reprezintă modul principal de stocare a colinei. Colina, alături de acetilcolină, este un transmitător important al influxului nervos și un purtător de grupări metil active.

Dipalmitoil lecitina este un agent surfactant foarte eficient, și prin aceasta un constituent major al sistemului de prevenire a aderențelor la suprafața internă a plămânilor. Această lecitină poate lipsi în plămânii nou-născuților prematuri, absență care produce un sindrom respirator acut.

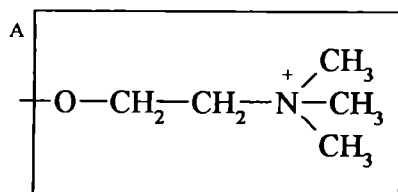
Fosfatidiletanolaminele (cefalinele) și fosfatidilserinele se găsesc în majoritatea țesuturilor.

Fosfatidilinozitolul este un precursor al unui mesager secundar. Inozitolul este prezent sub forma stereoisomerului **miinozitol**. **Fosfatidilinozitol 4,5-bifosfatul** reprezintă un constituent important al fosfolipidelor membranare. În urma stimulării cu un agonist hormonal potrivit, este scindat în **diacilglicerol** și **inozitol trifosfat**, amândoi acționând pe post de mesageri secundari.

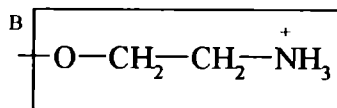
Cardiolipinele reprezintă lipide majore din membranele mitocondriale. Acizii fosfatidici sunt precursori ai **fosfatidilglicerolului** care la rândul său intră în constituția cardiolipinelor.



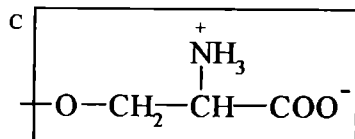
acid fosfatidic



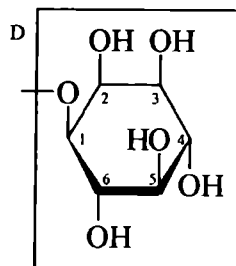
colina



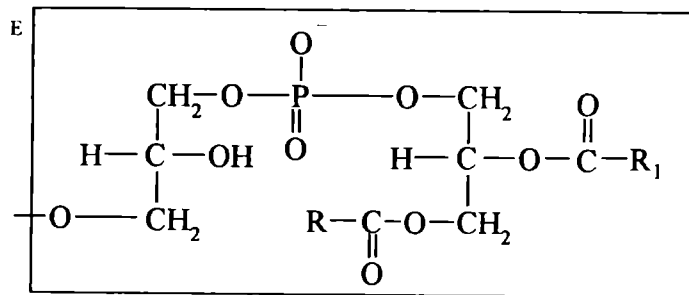
etanolamina



serina



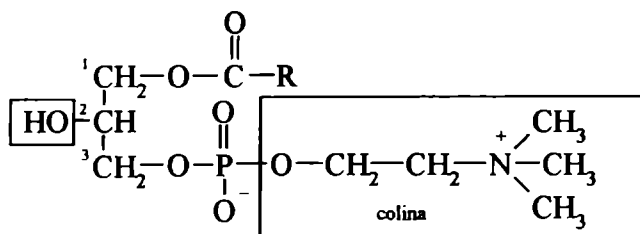
miinozitol



fosfatidil glicerol

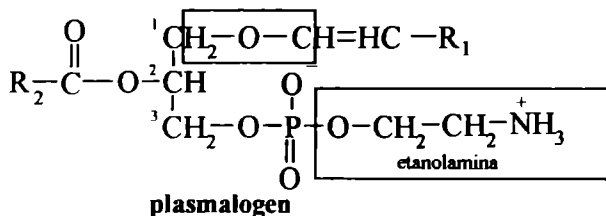
Figura 8.4. Acizii fosfatidici și derivații lor. Gruparea $-\text{O}^-$ reprezentată în chenar poate fi substituită cu anumiți substituenți pentru a se forma (A) 3-fosfatidilcolină, (B) 3-fosfatidiletanolamină, (C) 3-fosfatidilserină, (D) 3-fosfatidilinozitol și (E) cardiolopină (difosfatidilglicerol).

Lizofosfolipidele sunt fosfoacilgliceroli care conțin un singur radical acil și sunt intermediari în metabolismul fosfoglicerolilor. Din această clasă fac parte **lizofosfatidilcoline (lizolecitinele)**, cu importanță în metabolizarea și interconversia fosfolipidelor. Se întâlnesc în lipoproteinele oxidate și sunt implicate în inducerea **aterosclerozei**.

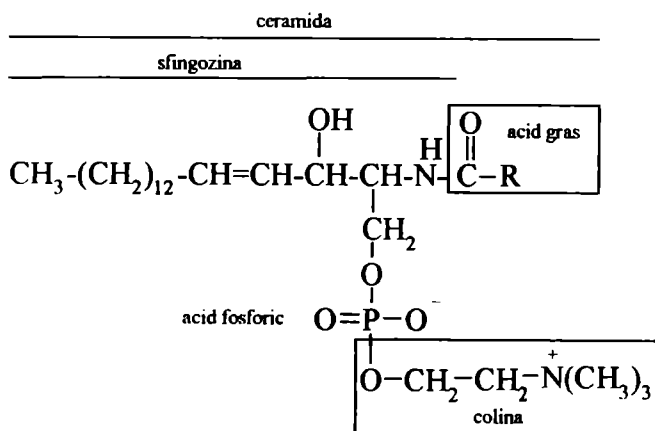


lizofosfatidilcolina (lizolecitina)

Plasmalogenii reprezintă circa 10% din totalul fosfolipidelor din creier și mușchi. Din punct de vedere structural, plasmalogenii sunt asemănători cu fosfatidiletanolaminele, doar că posedă o legătură eterică la carbonul *sn*-1 în locul unei legături esterice. De obicei, radicalul alchil din legătura eterică provine de la un alcool nesaturat. În unele cazuri, colina, serina sau inozitolul pot fi substituite cu etanolamină.



Sfingomielinele se găsesc în cantități mari în țesuturile cerebral și muscular. La hidroliza sfingomielinelor rezultă un acid gras, acid fosforic, colină și un aminoalcool complex, numit **sfinгоzină**. În structura sfingomielinelor nu există glicerol.



sfingomielina

Combinațiile dintre sfingozină și un acid gras sunt cunoscute sub numele de **ceramide**, structuri de asemenea întâlnite în glicosfingolipide.

8.7. Glicolipide

Glicolipidele sunt larg răspândite în fiecare țesut din organism, și în special în țesuturile nervoase (țesutul cerebral). Se întâlnesc cu precădere în lamela exterioară a membranelor plasmactice, fiind una din formele de răspândire a carbohidraților la suprafața celulelor. Forma predominantă de glicolipide animale o constituie **glicosfingolipidele**, care conțin ceramide și unul sau mai mulți carbohidrați. **Galactozilceramidele** sunt principalele glicosfingolipide din creier și alte țesuturi nervoase, în alte țesuturi găsiindu-se în cantități relativ mici. În structura lor intră un număr de acizi grași caracteristici C_{24} , de exemplu acidul cerebronic. Galactozilceramidele pot fi transformate în sulfogalactozilceramide (**sulfatide**), prezente în cantități mari în mielină.

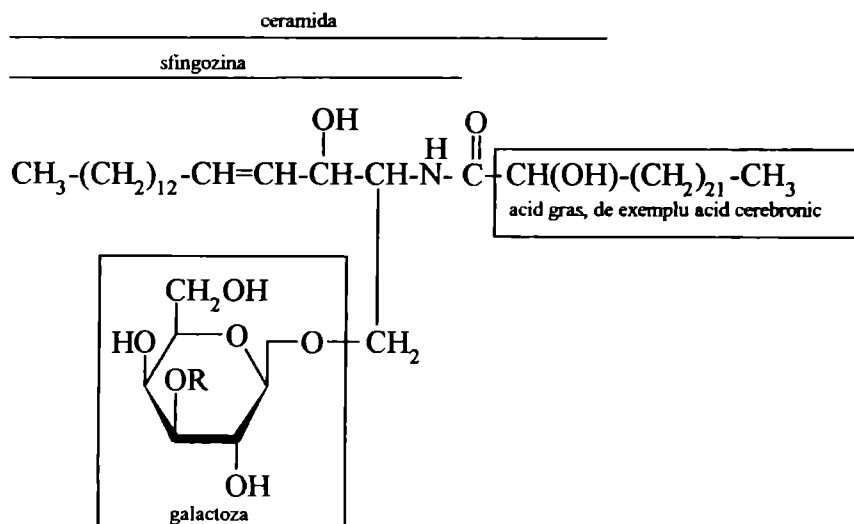


Figura 8.5. Structura unei **galactozilceramide** (**galactocerebrozidă**, $R = \text{H}$) și a unei **sulfogalactozilceramide** (**sulfatidă**, $R = \text{SO}_4^{2-}$).

Glucozilceramidele reprezintă forma predominantă de glicosfingolipide simple din structura țesuturilor extraneuronale, găsiindu-se în cantități mici și în creier.

Ganglioizidele sunt glicosfingolipide complexe care derivă de la glucozilceramide care conțin în plus una sau mai multe molecule de **acid sialic**. Acidul neuraminic (Secțiunea 7.3.2) este principalul acid sialic care se găsește în organismul uman. Ganglioizidele sunt prezente în țesuturile nervoase în cantități mari, unde îndeplinesc mai multe funcții, printre care cea de receptori. Cel mai simplu gangliozid descris în țesuturi este denumit G_{M3} și este alcătuit din ceramidă, o moleculă de glucoză, o moleculă de

galactoză și o moleculă de acid acetilneuraminic (NeuAc). Nomenclatura stenografică a gangliozidelor, *G* reprezintă „gangliozid”, *M* „specie monosialo-”, iar 3 este un număr conferit pe baza de migrării cromatografice. GM₁, o gangliozidă mai complexă care derivă din GM₃ prezintă un interes biologic deosebit, ea fiind receptorul intestinal pentru toxina holerică.

Alte gangliozide pot conține de la una la cinci molecule de acid sialic (mono-, di-, trisialogangliozide, etc.).

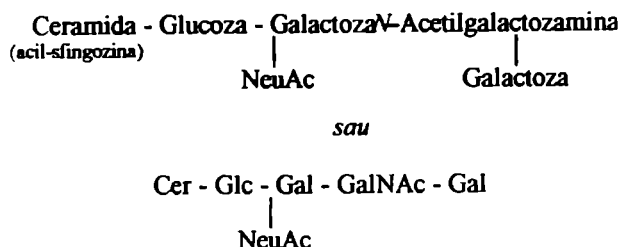
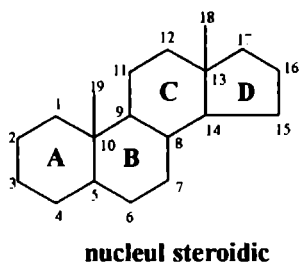


Figura 8.6. Gangliozida GM₁, o monosialogangliozidă, este receptorul pentru toxina holerică din intestinul uman

8.8. Steroizi

Toți sterozii au o structură similară, având un ciclu asemănător fenantrenului (inelele A, B și C) la care este atașat un inel ciclopentanic (D).



De cele mai multe ori există o catenă legată în poziția 17 (ca în cazul colesterolului). Dacă substanța conține una sau mai multe grupări hidroxil, fără a avea grupări carbonil sau carboxil, steroidul respectiv face parte din clasa **steroli**.

La sterozii naturali, toate ciclurile au conformație „scaun” (conformație mai stabilă decât cea „baie”). Joncțiunea dintre ciclurile A și B poate avea configurație atât *cis* cât și *trans* în sterozii naturali, spre deosebire de joncțiunile B/C și C/D care au de obicei configurație *trans*. Legăturile care atașează substituenți deasupra planului nucleului steroidic (legături β) sunt reprezentate cu linii groase,

iar legăturile care atașează substituenți sub planul nucleului steroidic (legături α) sunt reprezentate cu linii punctate. Inelul A al unui steroid 5α este întotdeauna *trans* față de inelul B, și *cis* în cazul unui steroid 5β . Grupările metil din pozițiile C-10 și C-13 au invariabil configurație β .

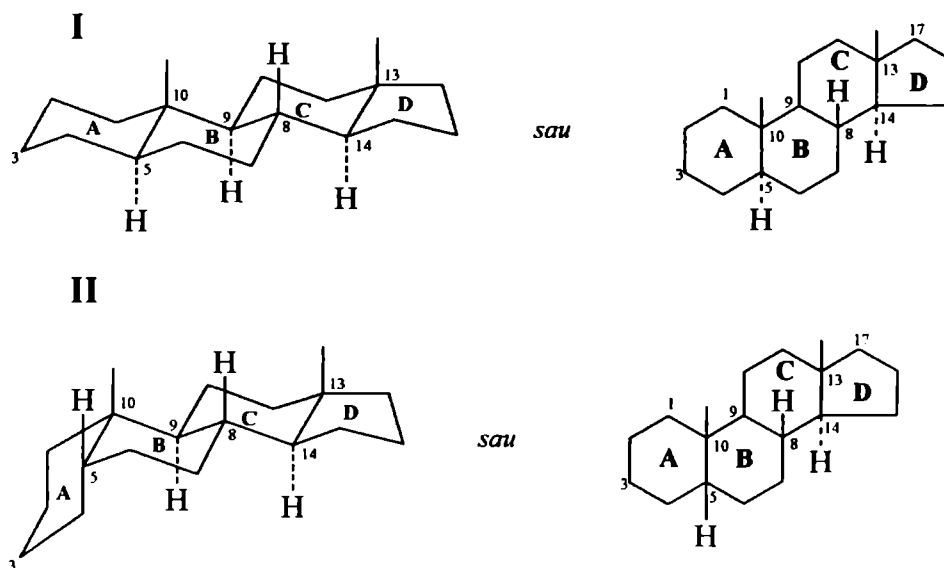
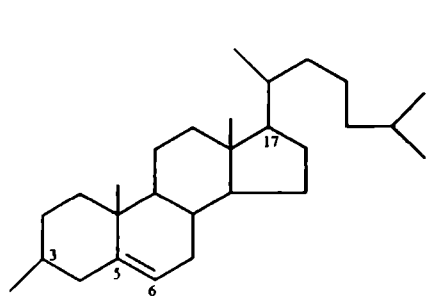


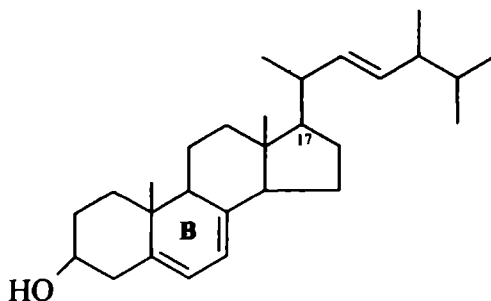
Figura 8.7. Structura generală a unui nucleu steroidic cu configurație **I** *all-trans* sau **II** cu configurație *cis* între inelele A și B.

8.7.1. Colesterolul

Colesterolul reprezintă probabil cel mai cunoscut steroid, datorită asocierii sale cu **ateroscleroza**. Colesterolul are o semnificație biochimică mult mai largă, deoarece el este precursor pentru o mulțime de alți steroizi, la fel de importanți: acizii biliari, hormoni adrenocorticoizi, hormoni sexuali, vitamine D, glicozide cardiace, precum și unii alcaloizi. Colesterolul este larg răspândit în toate celulele organismului, dar în mod deosebit în țesutul nervos. Este un constituent major al membranei plasmatică și a lipoproteinelor plasmatică. Se găsește în special sub formă de ester de colesteril, în care gruparea hidroxil din poziția 3 este esterificată cu un acid gras cu catenă lungă. Colesterolul este răspândit în regnul animal, dar nu și în plante.



Colsterol (3-hidroxi-5,6-colesten)



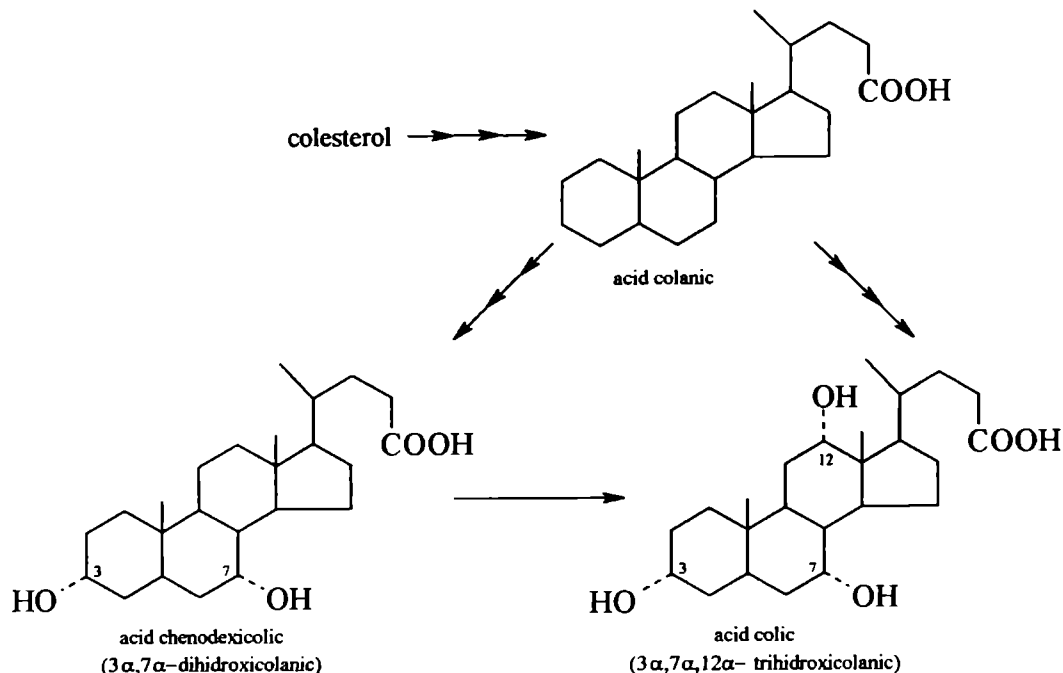
Ergosterol

Colesterolul poate fi de origine **exogenă** (alimentară), dar predominant are origine **endogenă**. Zilnic sunt introduse în organism 300-700 mg colesterol de origine alimentară, dintre care sunt absorbite la nivelul intestinului 30-50%. Absorbția sa necesită, ca pentru toate celelalte componente lipidice, prezența în intestinul subțire a acizilor biliari. Colesterolul tisular provine din biosinteza care se desfășoară foarte activ la nivelul ficatului și glandelor suprarenale, iar în proporție mai redusă în toate țesuturile. Imediat după sinteza sa, colesterolul endogen este integrat în lipoproteine – VLDL și HDL – majoritatea fiind esterificat în plasmă cu acid linoleic (VLDL = „very low density lipoprotein”, HDL = „high density lipoprotein”). De menționat că țesutul nervos și mai ales calculii biliari se caracterizează printr-un conținut ridicat de colesterol, de unde a fost izolat prima dată. **Ergosterolul** se găsește în plante și drojdii și pezință importanță ca precursor al vitaminei D. Când este iradiat cu lumină ultravioleă, ergosterolul capătă proprietăți anti-rahitice în urma deschiderii ciclului B.

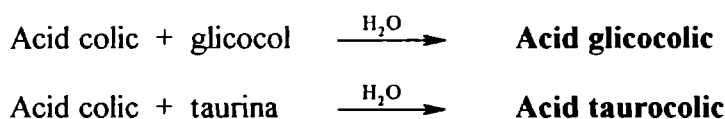
8.7.2. Acizii biliari

Cea mai mare parte din colesterolul hepatic (70-80%) este transformat în **acid colanic**, prin saturarea dublei legături C5-C6 concomitent cu scindarea oxidativă la C24.

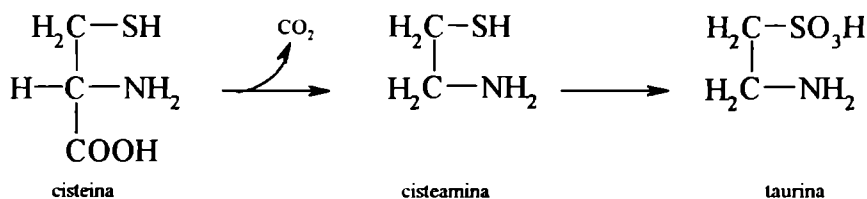
Acizii biliari pot fi considerați ca derivați hidroxilați ai acidului colanic, fiind denumiți și **steroizi C24**. Sinteza acidului colanic are loc în microzomii hepatici sub acțiunea citocromului P₄₅₀ și a vitaminei C care participă în procesele de hidroxilare; ulterior aceștia sunt deversați în **vezica biliară**. Acidul **colic** și **chenodeoxicolic** sunt considerați **acizi biliari primari**, fiind sintetizați la nivelul ficatului din colesterol. În lumenul intestinal, sub acțiunea microorganismelor, sunt sintetizați din acizi biliari primari acidul **deoxicolic** (3 α ,12 α -dihidroxicolanic) și acidul **litocolic** (3 α -hidroxicolanic), denumiți **acizi biliari secundari**.



Acizii biliari se găsesc în bilă în cea mai mare parte sub formă de amide, rezultate în urma condensării cu **glicocolul** sau **taurina**, cu care formează **acizii biliari conjugați**.



Taurina se obține din aminoacidul cisteină.



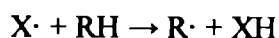
Acizii biliari liberi, conjugați și sărurile acestora sunt substanțe tensioactive cu un puternic efect emulsionant asupra lipidelor. Prezintă regiuni cu **caracter hidrofil**, datorită grupărilor hidroxilice polare și grupărilor $-\text{COO}^-$ sau $-\text{SO}_3^-$; nucleul steroidic prezintă un **caracter hidrofob**. Regiunile hidrofobă și hidrofilă ale moleculei au o dispoziție diferită de cea a lipidelor amfipatice; toate grupările hidroxil care au afinitate pentru apă sunt situate de aceeași parte a moleculei, cealaltă parte a moleculei

având un caracter hidrofob. Acizii biliari acționează la nivelul intestinului ca **agenți de emulsionare** ai lipidelor, facilitând absorbția lipidelor emulsionate sau scindarea lor enzimatică de către lipaze. Activează secreția pancreasului, determinând creșterea în duoden a cantității de lipază pancreatică, concomitent cu stimularea acesteia. Intervin în **controlul sintezei colesterolului și autoreglarea sintezei** lor hepatice; scăderea concentrației sărurilor biliare în intestinul subțire induce creșterea sintezei colesterolului la acest nivel, deoarece o cantitate mai mare de colesterol devine disponibil pentru transformarea sa în săruri biliare.

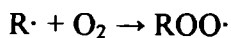
8.9. Peroxidarea lipidelor

Peroxidarea (autooxidarea) lipidelor expuse la oxigen este cauza nu numai a deteriorării alimentelor (rânzirea) dar și a vătămării țesuturilor *in vivo* cu urmări grave precum cancerul, afecțiunile inflamatorii, ateroscleroza sau procesul de îmbătrânire. Aceste efecte nocive sunt cauzate de radicali liberi ($\text{ROO}\cdot$, $\text{RO}\cdot$, $\text{HO}\cdot$) produși în timpul formării peroxizilor din acizi grași care conțin duble legături separate prin grupări metilen, cum sunt acizii grași polinesaturați. Peroxidarea lipidelor este o reacție în lanț, în care se formează continuu radicali liberi care inițiază peroxidări ulterioare. Întregul proces al peroxidării conține etapele:

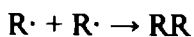
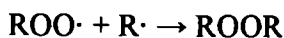
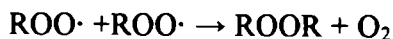
(1) Inițierea:



(2) Propagarea:



(3) Întreruperea:



Deoarece precursorul molecular pentru procesul de inițiere este de regulă produsul de reacție, hidroperoxidul ROOH, peroxidarea lipidelor este o reacție în lanț cu efecte devastatoare. Pentru a controla și a reduce peroxidarea lipidelor, natura recurge la ajutorul **antioxidanților**. Esterul propilic al acidului galic, butilhidroxianisolu (BHA), butilhidroxitoluenul (BHT) sunt exemple de antioxidanți alimentari. Antioxidanții naturali includ vitaminele E (tocoferoli, liposolubili), urații și vitamina C (hidrosolubili). β -Carotenul are activități antioxidante la P_{O_2} scăzute. Antioxidanții sunt împărțiți în două clase:

- 1) Antioxidanți preventivi, care reduc viteza etapei de inițiere, cum ar fi catalaza, peroxidazele care reacționează cu ROOH, unii agenți de chelare ai ionilor metalici (EDTA, etilendiaminetetraacetat, sau DTPA, dietilentriaminopentaacetat).
- 2) Antioxidanți care întrerup reacțiile în lanț, prin împiedicarea propagării reacțiilor. În sistemele vii, principalii antioxidanți din această categorie sunt superoxid dismutaza, care acționează în fază apoasă asupra anionilor-radical superoxid ($O_2^{\cdot-}$), probabil urații, și vitaminele E, care acționează în fază lipidică asupra radicalilor.

Peroxidarea mai este catalizată *in vivo* de compuși cu hem și de **lipoxigenazele** care se găsesc în trombocite și leucocite. Alți produși de autooxidare sau de oxidare enzimatică a lipidelor cu semnificație biologică includ **oxisterolii** (formați din colesterol) și **izoprostanii** (prostanoidele).

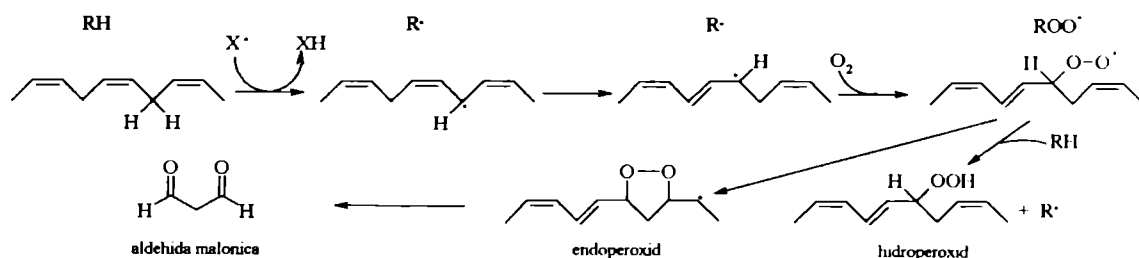


Figura 8.8. Peroxidarea lipidelor. Reacția este inițiată de către un radical liber preexistent ($X^\bullet$), lumină, sau ioni metalici. Aldehida malonică se formează numai din acizi grași cu trei sau mai multe legături duble și se reprezintă un indice a peroxidării, alături de etan (din cei doi atomi de carbon terminali în cazul acizilor $\omega 3$) sau pentan (din cei cinci atomi de carbon terminali în cazul acizilor $\omega 6$)

8.10. Orientarea lipidelor amfipatice la nivelul interfețelor ulei-apă

În general lipidele sunt insolubile în apă, deoarece ele conțin predominant grupări nepolare. Cu toate acestea, acizii grași, fosfolipidele, sfingolipidele, sărurile biliare, și în mai mică măsură colesterolul, conțin grupări polare. Prin urmare, o parte a moleculei este **hidrofobă**, sau insolubilă în

apă, iar o parte este **hidrofilă**, sau solubilă în apă. Aceste molecule sunt **amfipatice**, ele orientându-se la nivelul interfețelor apă-grăsime cu grupările polare în faza apoasă și cu grupările nepolare în faza uleioasă. Structura de bază a membranelor biologice este alcătuită din **bi-straturi** de lipide amfipatice. Când lipidele amfipatice ating o concentrație critică într-un mediu apos, ele formează **micelii**.

Agregarea sărurilor acizilor biliari în micelii și lipozomi și formarea miceliilor mixte din produșii digestiei lipidelor reprezintă un fenomen de bază pentru facilitarea absorbției lipidelor din intestin.

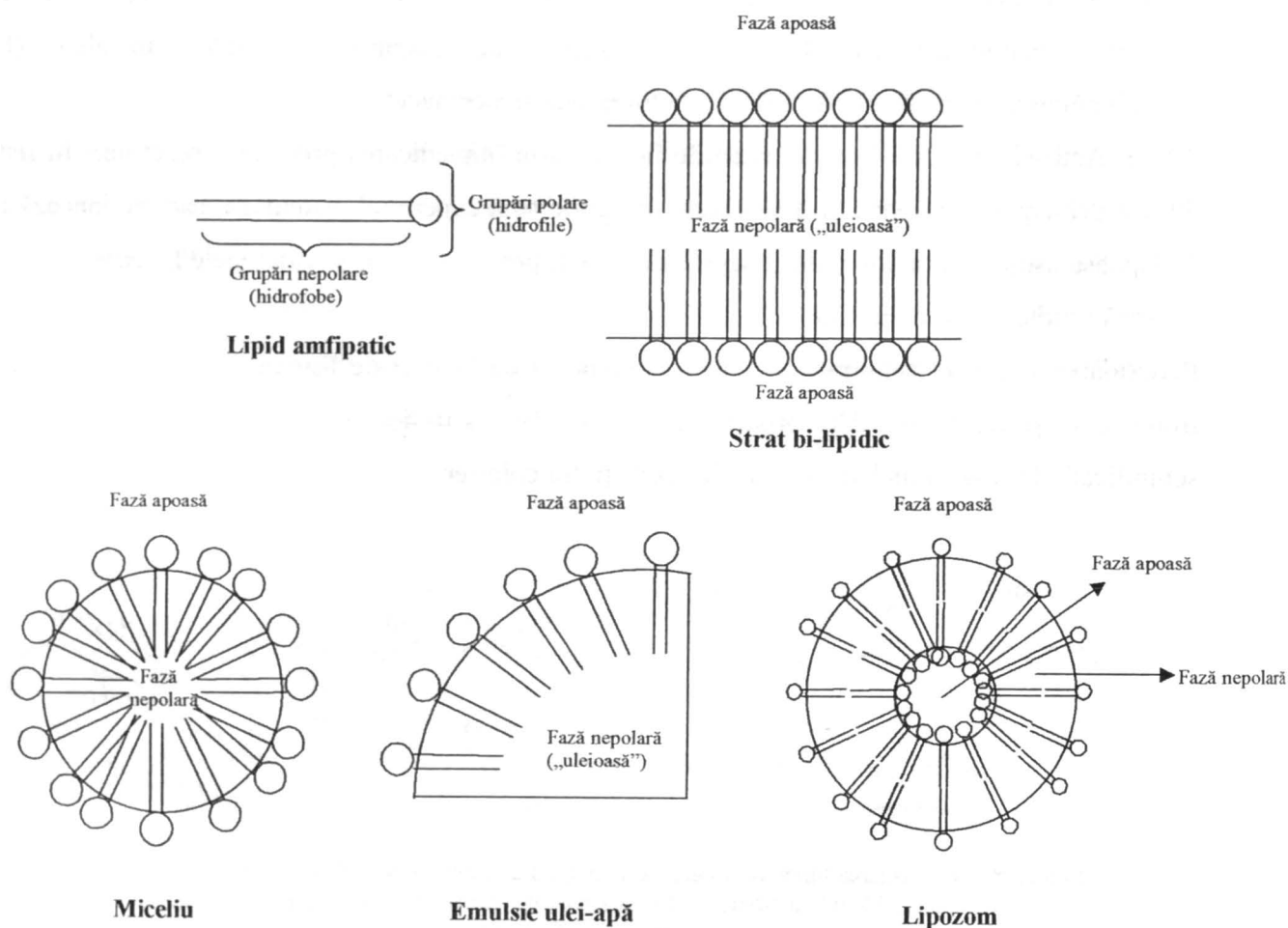


Figura 8.9. Formarea membranelor lipidice, miceliilor, emulsiilor și lipozomilor din lipide amfipatice (de exemplu fosfolipide).

Lipozomii se pot obține prin sonicarea unor lipide amfipatice într-un mediu apos. Lipozomii sunt sfere alcătuite din straturi duble lipidice care includ o parte din mediul apos. Au importanță clinică, în special când sunt combinați cu anticorpi tisular-specifici, fiind utilizați ca transportori prin

sistemul circulator ai unor medicamente la anumite organe țintă în terapia cancerului. Lipozomii sunt utilizați și pentru transferul de gene în celulele vasculare sau ca transportori în administrarea prin piele a unor medicamente sau cosmetice. **Emulsiile** sunt particule mult mai mari care apar la dispersarea lipidelor nepolare într-un mediu apos. Sunt stabilizate de agenți emulgatori cum ar fi lipidele amfipatice (lecitinele) care formează un film la suprafața de separație dintre materialul nepolar și faza apoasă.

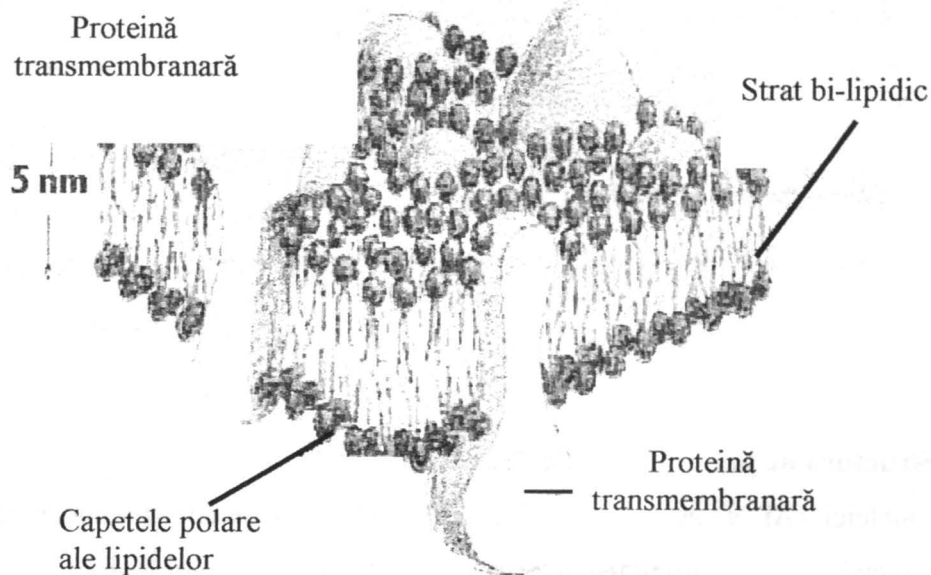


Figura 8.10. Structura bi-lipidică a membranelor celulare. Membranele celulare sunt alcătuite din două straturi de lipide amfipatice care includ o serie de proteine membranare.

9. Structura Acizilor Nucleici

Descoperirea faptului că informația genetică este codificată de-a lungul unei molecule polimere alcătuită din numai patru tipuri de unități monomere a reprezentat una din cele mai importante realizări științifice a secolului XX. Această moleculă polimeră, ADN, reprezintă baza chimică a eredității și este organizată în gene, care constituie unitățile fundamentale ale informației genetice. Călea urmată de informație pornește de la ADN, direcționând sinteza ARN, care la rândul său direcționează sinteza proteică. Genele nu funcționează autonom; replicarea și funcțiile lor sunt controlate de diverși produși ai genelor, de multe ori în colaborare cu componente ale unor căi de reglare prin transducție. Cunoașterea structurii și funcționării acizilor nucleici este esențială pentru a înțelege procesele genetice, ca și multe aspecte ale patofiziologiei și ale bazei genetice a bolilor.

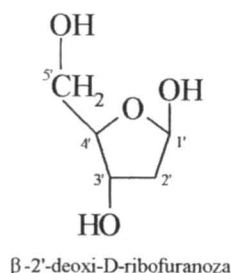
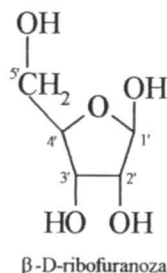
Nucleotidele – unitățile monomerice ale acizilor nucleici – au o multitudine de alte funcții. Astfel, ele intră în alcătuirea unor coenzime sau acționează ca donori de grupări fosfat (ATP, GTP), de grupări glicozil (UDP-zaharid, GDP-zaharid) sau de grupări lipidice (CDP-acilglicerol). O serie de mecanisme reglatoare implică mesagerii secundari cAMP și cGMP, controlul de către ADP a fosforilării oxidative, sau reglarea enzimelor alosterice de către ATP, AMP și CTP. Analogi sintetici ai purinelor și pirimidinelor care conțin halogeni, grupări tiol sau grupări cu azot sunt utilizați în chimioterapia unor boli precum cancerul sau SIDA, sau ca inhibitori ai răspunsului imun în cazul transplanturilor de organe.

9.1. Nucleotide

9.1.1. Structura nucleozidelor și nucleotidelor

Acizii nucleici (ADN, acizii deoxiribonucleici și ARN, acizii ribonucleici) sunt lanțuri de monozaharide cu ciclu de cinci atomi legate prin intermediul unor grupări fosfat.

În ARN, monozaharidul constituent este β -D-ribofuranaza, iar în ADN β -2'-deoxi-D-ribofuranaza (numerotarea atomilor se face cu cifre marcate, pentru a face deosebire de numerotarea atomilor din bazele azotate).



Atomul de carbon anomerice din fiecare monozaharid se leagă de un atom de azot provenit de la un compus heterociclic cu caracter bazic, provenite din purină sau pirimidină (baze azotate purinice sau pirimidinice).

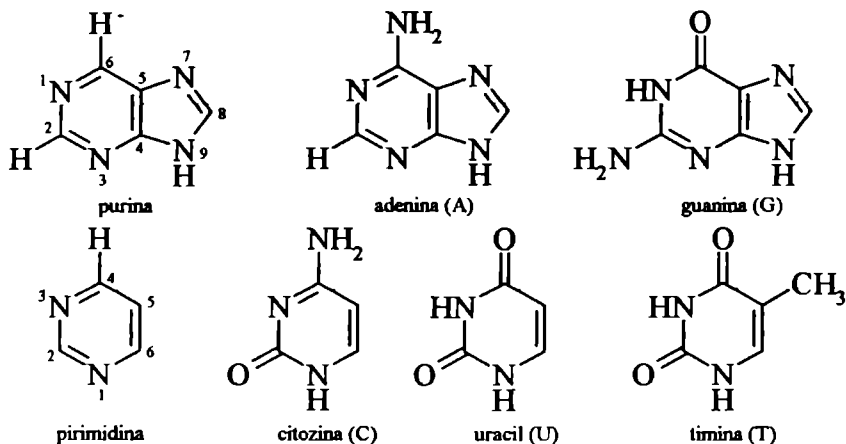


Figura 9.1 Bazele purinice și pirimidinice tipice prezente în structura acizilor nucleici

ARN conține patru baze. Trei dintre ele (adenina, citozina și guanina) sunt la fel ca în ADN, a patra bază din ARN fiind uracilul, în loc de timină, care intră în constituția ADN-ului. Purinele și pirimidinele se leagă de carbonul anomic al ciclului furanozic prin atomii N-9 și respectiv N-1 prin legături β -glicozidice.

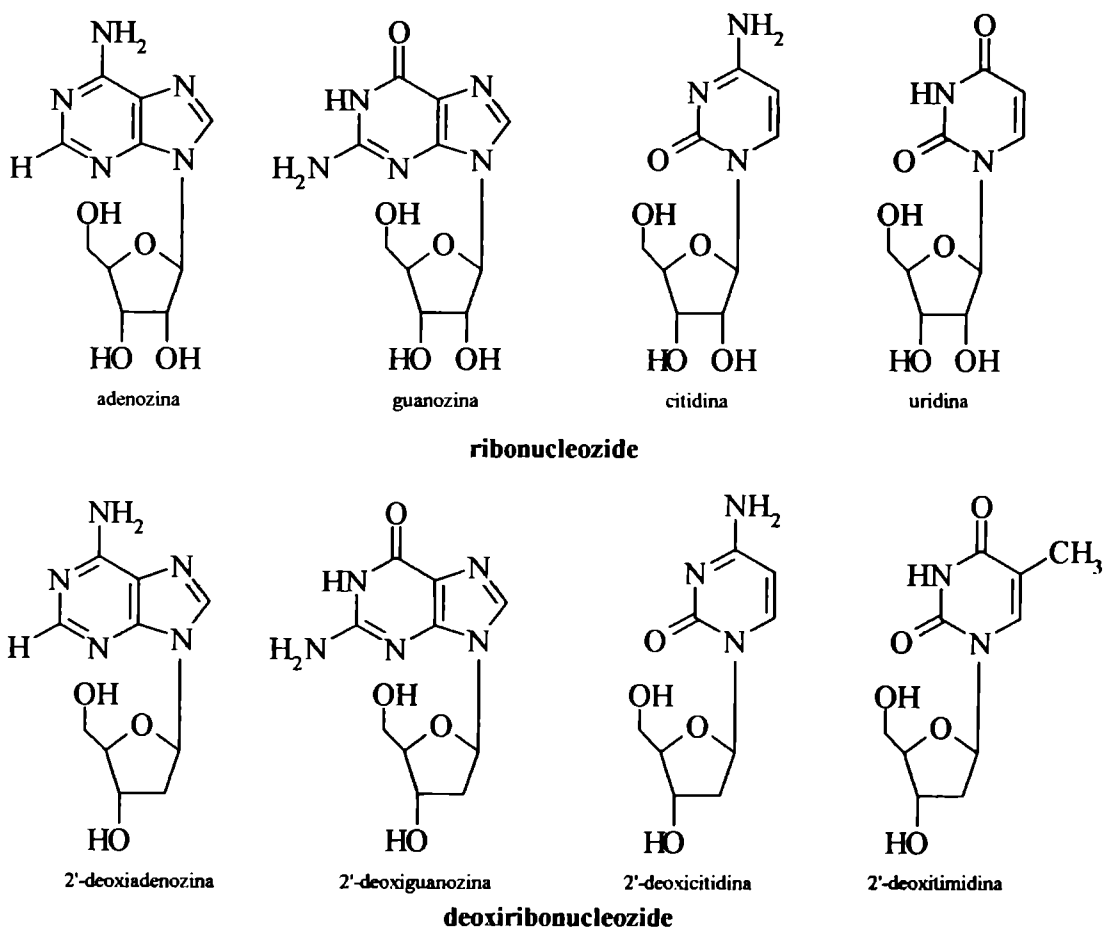


Figura 9.2. Structura nucleozidelor. Un nucleozid = monozaharid + bază.

Un **nucleotid** este alcătuit dintr-un nucleozid cu gruparea OH din poziția 3' sau 5' legată printr-o legătură esterică de acidul fosforic. Nucleotidele din ARN (în care monozaharidul este D-riboza) se numesc **ribonucleotide**, în timp ce nucleotidele din ADN (în care monozaharidul este 2'-deoxi-D-riboza) se numesc **deoxiribonucleotide**. (Un nucleotid = monozaharid + bază + fosfat). Deoarece majoritatea nucleotidelor sunt 5', prefixul 5' se omite când acestea sunt denumite.

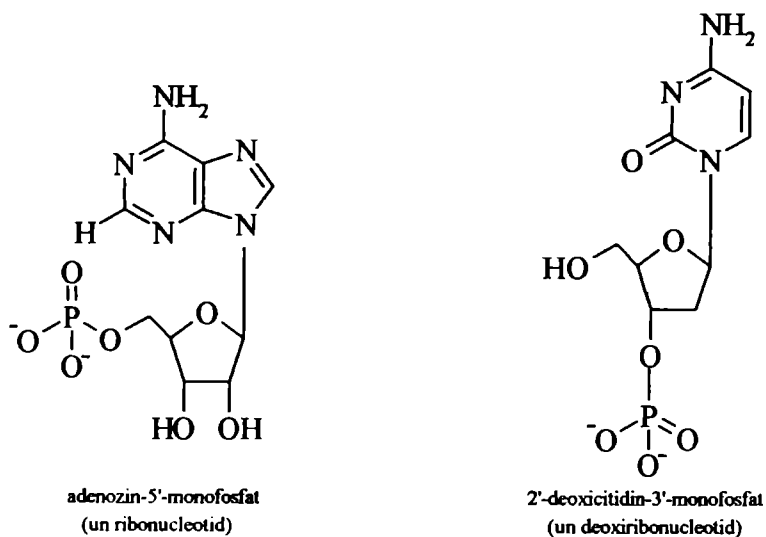
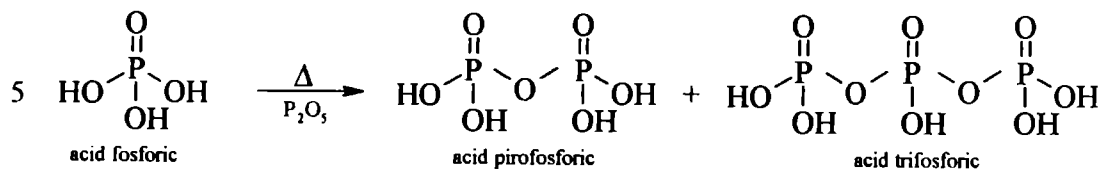


Figura 9.3. Structura nucleotidelor. Un nucleotid = fosfat + monozaharid + bază.

Când acidul fosforic este încălzit cu P_2O_5 , el pierde apă, formând o anhidridă numită acid pirofosforic (de la grecescul *pyr*, care înseamnă „foc”), alături de acid trifosforic și alți acizi polifosforici.



Și nucleotidele pot exista ca monofosfați, difosfați sau trifosfați, fiind denumite prin adăugarea sufixelor *monofosfat*, *difosfat* sau *trifosfat* la numele nucleozidului corespunzător.

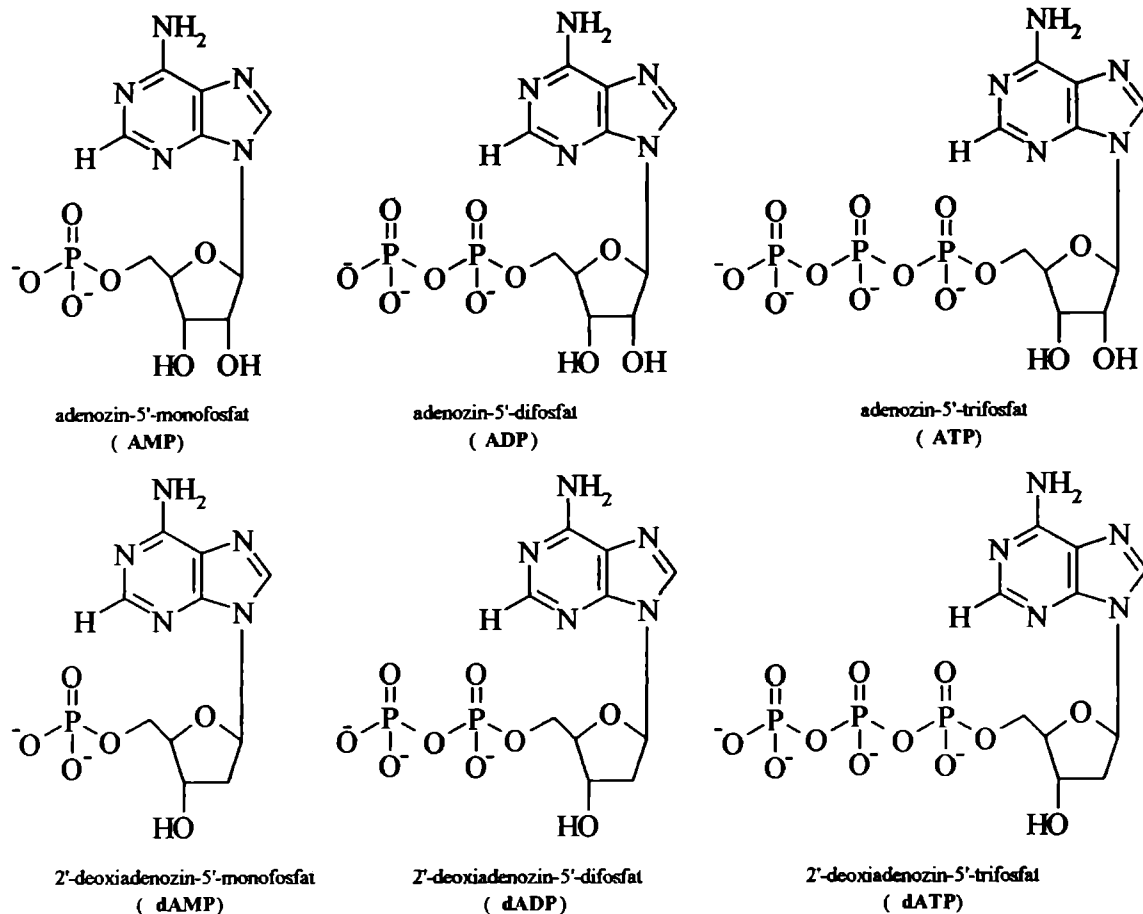


Figura 9.4. Structura nucleotid mono-, di- și trifosfaților.

Pentru identificarea bazelor azotate adenină, guanină, citozină, uracil sau timină se folosesc inițialele corespunzătoare A, G, C, U și respectiv T, indiferent dacă sunt libere sau legate în nucleozide sau nucleotide. Prefixul „d” (deoxi) indică faptul că monozaharidul este 2'-deoxi-D-riboză (vezi Tabelul 9.1).

Tabelul 9.1. Denumirile bazelor, nucleozidelor și a nucleotid trifosfaților

Bază	Ribonucleozid	Deoxinucleozid	Ribonucleotid	Deoxiribonucleotid
adenină (A)	adenozină	2'-deoxiadenozină	adenozin 5'-trifosfat (ATP)	2'-deoxiadenozin 5'-trifosfat (dATP)
guanină (G)	guanozină	2'-deoxiguanozină	guanozin 5'-trifosfat (GTP)	2'-deoxiguanozin 5'-trifosfat (dGTP)
citozină (C)	citidină	2'-deoxicitidină	citidin 5'-trifosfat (CTP)	2'-deoxicitidin 5'-trifosfat (dCTP)
timină (T)	timidină	2'-deoxitimidină	timidin 5'-trifosfat (TTP)	2'-deoxitimidin 5'-trifosfat (dTTP)
uracil (U)	uridină	2'-deoxiuridină	uridin 5'-trifosfat (UTP)	2'-deoxiuridin 5'-trifosfat (dUTP)

Rotația în jurul legăturii β -N-glicozidice din nucleozide și nucleotide este restricționată datorită împiedicărilor sterice, existând două conformații: *sin* și *anti*. Ambele conformații sunt prezente în natură, deși cea *anti* este predominantă.

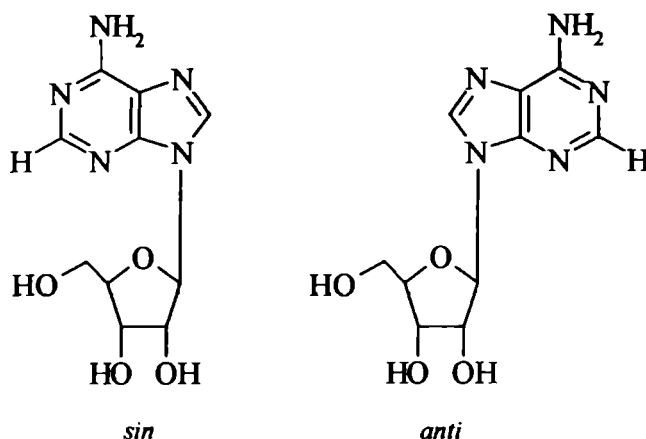


Figura 9.5. Conformerii *sin* și *anti* ai adenzinei sunt diferiți în privința orientării bazei azotate în raport cu legătura glicozidică.

9.1.2. Alte baze prezente în structura acizilor nucleici

În anumite molecule de ADN și ARN se găsesc în cantități mici și baze purinice sau pirimidinice atipice, ca de exemplu 5-metilcitozina care se întâlnește în ADN-ul uman și bacterian, 5-hidroximetilcitozina din ADN-ul viral și bacterian, mono- și di-metil-adeninele și guaninele din ARN-ul mesager de la mamifere.

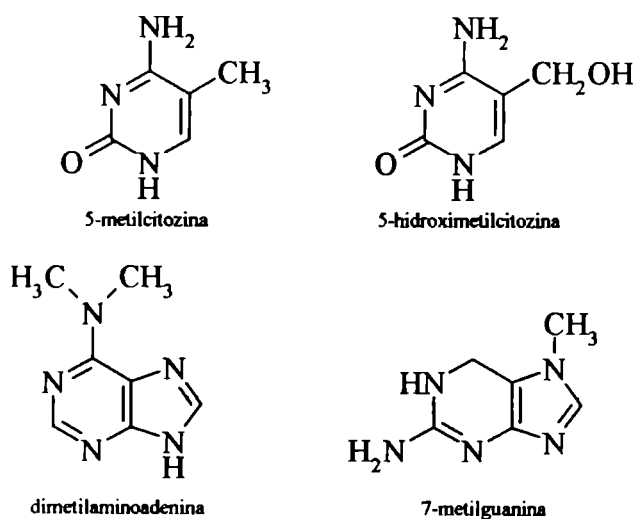


Figura 9.5. Baze purinice și pirimidinice atipice.

Bazele atipice au rol în procesele de recunoaștere nucleotidică și în reglarea duratei de viață a ARN-urilor. Printre nucleotidele libere atipice se numără hipixantina, xantina și acidul uric, intermediari în catabolismul adeninei și guaninei. Bazele azotate metilate din plante includ derivații xantینici cafeină (cafea), teofilină (ceai) și teobromină (cacao).

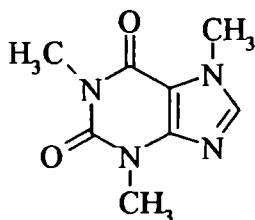


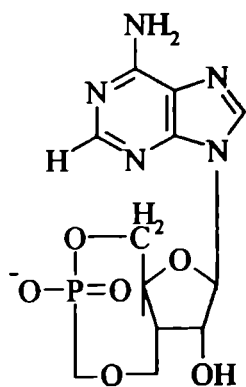
Figura 9.7. Cafeina, o trimetil-xantină. Dimetilxantinele teobromina și teofilina sunt similare, dar le lipsește o grupare metil în poziția N-1 și respectiv N-7.

9.1.3. Rolul biologic al nucleotidelor

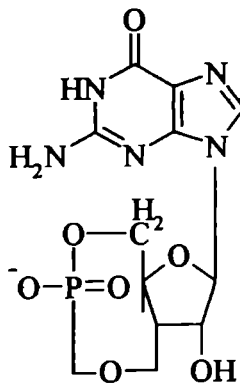
Nucleotidele participă într-o serie de reacții care îndeplinesc funcții fiziologice de o mare diversitate, cum ar fi sinteza proteinelor, sinteza acizilor nucleici, mecanismele reglatoare în cascadă, etc. Anhidridele acide, spre deosebire de esterii fosforici, au un potențial mare de a transfera grupări fosfat. La hidroliza fiecărui fosfat terminal dintr-un nucleotid trifosfat, Δ^0 este de aproximativ -7 kcal/mol. Acest potențial mare de transfer face ca purin- și pirimidin-trifosfații să joace rol de donori de grupări fosfat. Clivarea unei legături anhidridice este cuplată cu un proces endergonic, cum ar fi formarea unor legături covalente (de exemplu polimerizarea nucleotid trifosfaților cu formarea acizilor nucleici).

Pe lângă rolul de precursori în sinteza acizilor nucleici, ATP, GTP, UTP, CTP, TTP și derivații lor au fiecare în parte funcții fiziologice specifice:

- ATP reprezintă principalul furnizor molecular de energie biologică;
- AMP-ul ciclic (cAMP) este unul din principalii mesageri secundari;

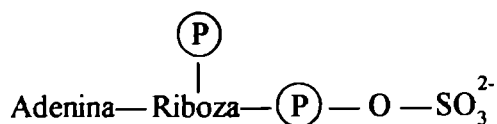


3',5'-cyclic AMP (cAMP)

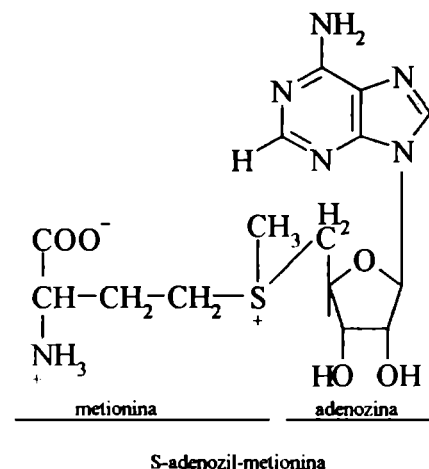


3',5'-cyclic GMP (cGMP)

- adenzin-3'-fosfat-5'-fosfosulfatul este principalul donator de grupări sulfat pentru proteoglicani și pentru conjugatele medicamentoase;



- S-adenozilmetionina este donator de grupări metil, etc.



GTP joacă rol de reglator alosteric și ca sursă de energie în sinteza proteinelor, iar cGMP acționează ca mesager secundar în răspunsul la oxidul de azot (NO) în procesul de relaxare musculară. Derivații glucidici ai UDP participă la epimerizarea și biosinteza glicogenului, a glucozildizaharidelor și a oligozaharidelor care intră în compoziția glicoproteinelor și proteoglicanilor. Acidul glucuronic conjugat formează conjugatele glucuronidice urinare (bilirubina). CTP participă la biosinteza

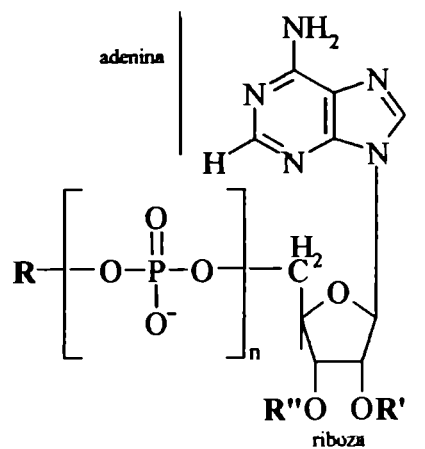
fosfogliceridelor, sfigomielinelor și a altor sfigozine substituite. În sfârșit, multe coenzime au în componența lor nucleotide sau structuri similare cu nucleotidele purinice și pirimidinice (Tabelul 9.2).

Tabelul 9.2. Coenzime și compuși înrudiți, derivați ai adenozin monofosfatului

Coenzima	R	R'	R''	n
Metionina activă	Metionină	H	H	0
Aminoacid adenilați	Aminoacid	H	H	1
Sulfat activ	SO ₃ ²⁻	H	PO ₃ ²⁻	1
3',5'cAMP		H	PO ₃ ²⁻	1
NAD ⁺	†	H	H	2
NADP ⁺	†	PO ₃ ²⁻	H	2
FAD	†	H	H	2
CoASH	†	H	PO ₃ ²⁻	2

†Înlocuiește o grupare fosfat

†R este un derivat al unei vitamine B



Nucleozidele și bazele azotate purinice sau pirimidinice sunt neîncărcate electric la pH-ul fiziologic. În schimb, nucleotidele sunt acizi polifuncționali. Grupările fosforil primare ($pK_a \sim 1$) și secundare ($pK_a \sim 6,2$) din nucleotide sunt încărcate negativ la pH-ul fiziologic. Nucleotidele acționează ca donori sau acceptori de protoni la pH-uri cu 1-2 unități mai mari, respectiv mai mici decât pH-ul neutru (7).

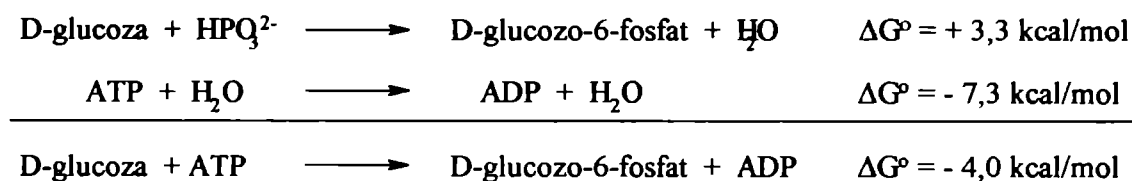
Datorită legăturilor conjugate, derivații purinici sau pirimidinici absorb lumină în domeniul ultraviolet. Efectul mutagenic al razelor ultraviolete se datorează tocmai acestei absorbții către nucleotidele din ADN, absorbție care de multe ori poate fi însoțită de modificări chimice. La pH 7, nucleotidele absorb lumină cu lungimea de undă aproximativ 260 nm, astfel încât concentrația nucleotidelor și a acizilor nucleici se exprimă în funcție de „absorbanța la 260 nm”.

9.1.4. ATP: purtătorul biomolecular de energie chimică

Adeozin 5'-trifosfatul (ATP) este cunoscut ca purtătorul universal de energie chimică, deoarece „energia rezultată la hidroliza ATP-ului transformă reacțiile endergonice în reacții exergonice”. Importanța pe care o are ATP-ul pentru reacțiile biochimice este demonstrată de rata sa de recirculare: zilnic, o persoană utilizează o cantitate de ATP echivalentă cu propria greutate. În mod evident, o

cantitate uriașă de ATP este hidrolizată în organism, concomitent cu resintetizarea sa, într-un proces continuu de recirculare.

Capacitatea ATP-ului de a face posibile reacții defavorizate din punct de vedere energetic este explicată prin cantitatea mare de energie care se degajă la hidroliza ATP-ului, energie care poate fi folosită pentru a iniția o reacție puternic endergonică. De exemplu, reacția D-glucozei cu hidrogen fosfatul pentru a forma D-glucozo-6-fosfatul este o reacție endergonică ($\Delta G^\circ = + 3,3 \text{ kcal/mol}$). Hidroliza ATP-ului, pe de altă parte, este puternic exergonică ($\Delta G^\circ = - 7,3 \text{ kcal/mol}$), astfel încât când cele două reacții sunt cuplate, întreg procesul devine exergonic.



Două reacții în care energia uneia este utilizată pentru producerea celeilalte se numesc **reacții cuplate**. Transferul unei grupări fosfat de la ATP la D-glucoză este un exemplu de reacție de transfer a unei grupări fosfat (fosforilare), reacții catalizate de tranferaze numite **kinaze**.

Deoarece hidroliza unei legături fosfoanhidridice este o reacție puternic exergonică, aceste legături de numesc **macroergice**.

9.1.5. Analogi sintetici ai nucleotidelor

Analogi sintetici ai purinelor, pirimidinelor, nucleozidelor sau nucleotidelor, care prezintă modificări fie la nivelul inelului heterociclic, fie al restului monozaharidic, au numeroase aplicații clinice. Astfel de analogi pot avea efect toxic care se exprimă fie prin inhibarea anumitor enzime necesare sintetizării acizilor nucleici, fie prin încorporarea lor în acizii nucleici ducând la perturbarea locală a structurii acizilor nucleici respectivi. Oncologii de exemplu utilizează 5-fluoro sau 5-iodouracil, 3-deoxiuridină, 6-tioguanină, 6-mercaptopurină, 5- sau 6-azauridină, 5- sau 6-azacitidină, 8-azaguanină, care sunt încorporate în ADN premărgător diviziunii celulare.

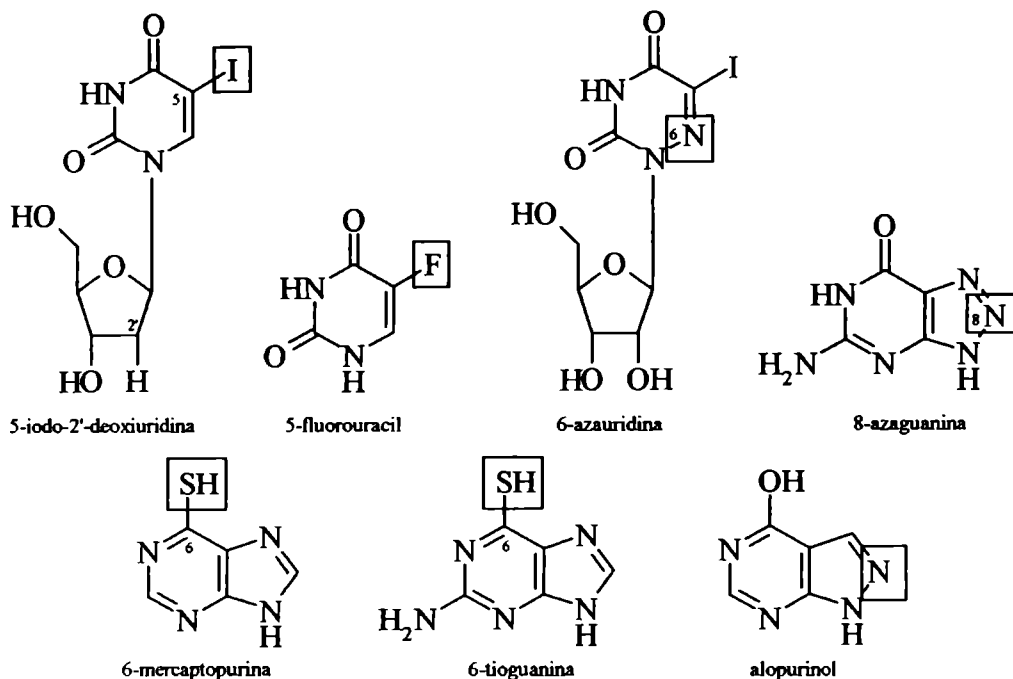


Figura 9.8. Structura câtorva analogi sintetici purinici și pirimidinici.

Analogul purinei alopurinol, utilizat în tratamentul hiperuricemiei și a gutei, inhibă biosinteza purinei și activitatea enzimei xantin oxidaza. Citarabina este utilizată în chimioterapia cancerului, iar azatriopina, care este catabolizată până la 6-mercaptopurină este folosită în transplanturile de organe, pentru a suprima reacția imunologică a grefei.

9.2. Acizi nucleici

9.2.1. Structura ADN

Acizii nucleici sunt alcătuiți din lanțuri lungi de nucleotide unite prin legături fosfodiesterice. Aceste legături unesc gruparea 3'-OH a unei nucleotide de gruparea 5'-OH a următoarei nucleotide. Un **dinucleotid** conține două unități, un **oligonucleotid** conține 3-10 unități, iar un **polinucleotid** conține un număr mare de unități nucleotidice. ADN și ARN sunt polinucleotide, în care nucleotidul de la un capăt al lanțului are o grupare 5'-trifosfat liberă, iar la celălalt capăt o grupare 3'-OH liberă.

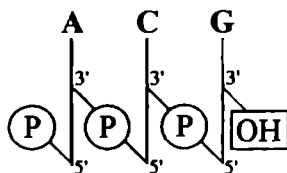


Figura 9.9. Reprezentarea schematică a unui trinucleotid.

Nucleotid trifosfații reprezintă materialul de pornire pentru biosinteza acizilor nucleici. ADN este sintetizat de enzime numite **ADN-polimeraze**, iar ARN este sintetizat de enzime numite **ARN-polimeraze**.

Catena nucleotidică se formează în urma atacului nucleofil al unei grupări 3'-OH a unui nucleotid trifosfat asupra atomului de fosfor din poziția α al unui alt nucleotid trifosfat sau al capătului 5'-liber al polinucleotidului în formare, cu ruperea legăturii pirofosforice și eliminare de pirofosfat. Polimerul nucleotidic este sintetizat unidirecționat, în direcția 5'→3'; cu alte cuvinte, noile nucleotide sunt adăugate la capătul 3'. Pirofosfatul este ulterior hidrolizat în două molecule de fosfat, ceea ce face ca reacția de polimerizare să fie ireversibilă.

Catenele de ARN sunt sintetizate în același mod, doar că în loc de 2'-deoxiribonucleotide se utilizează ribonucleotide. La fel ca proteinele, acizii nucleici au atât structură primară cât și secundară. **Structura primară** a acizilor nucleici este dată de secvența bazelor azotate din catenă.

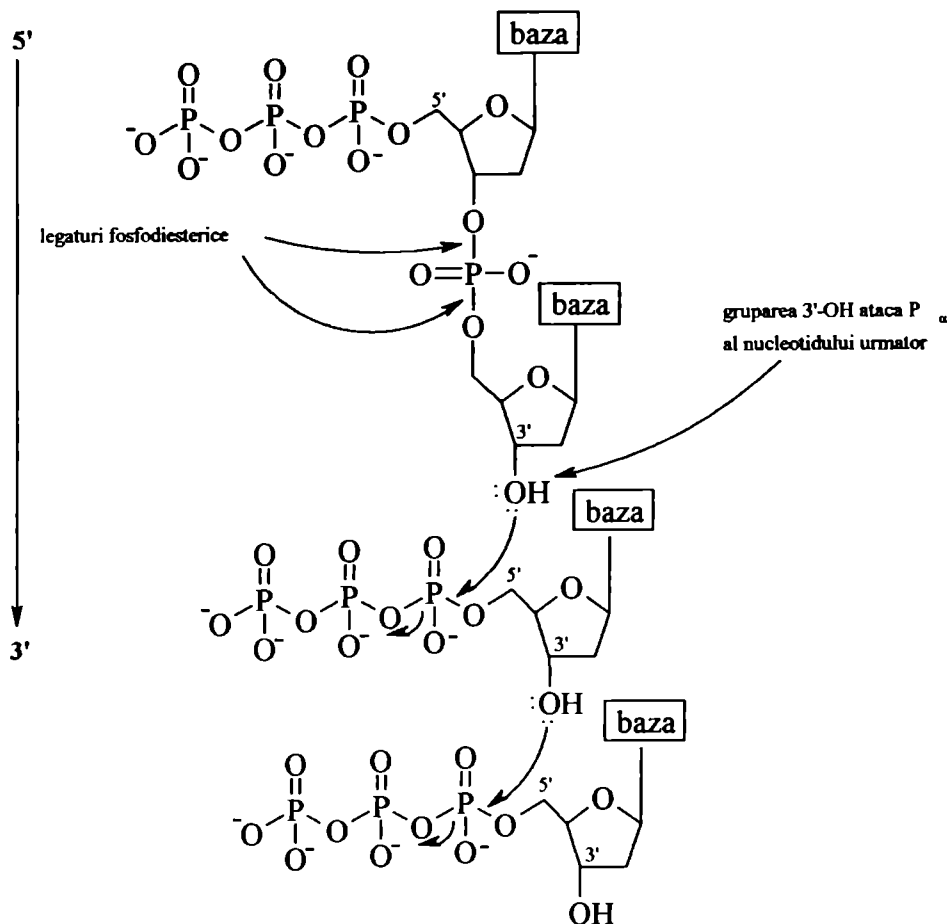


Figura 9.10. Modul de creștere a unei catene polinucleotidice în procesul de biosinteză a ADN.

ADN conține informația genetică într-un organism

Faptul că ADN conține informația genetică a fost demonstrat prima dată de Averz, McLeod și McCarty într-o serie de experimente care au demonstrat că tipul capsulei unui anumit tip de pneumococ este determinată genetic și poate fi transmisă unui pneumococ cu alt tip capsular, prin transferul de ADN purificat de la un tip de pneumococ la celălalt. Ulterior, astfel de manipulare genetică a devenit rutină, iar experimente similare se fac frecvent utilizând drojdii, culturi de celule, insecte sau embrioni de mamifere ca acceptori de informație genetică, transferată sub formă de ADN clonat.

Informația genetică cuprinsă în ADN constă în secvența în care sunt aranjate deoxiribonucleotidele. Deoarece informația genetică constă în ordinea în care se succed unitățile monomerice în cadrul polimerului, atunci trebuie să existe un mecanism de reproducere sau replicare cu un grad mare de fidelitate a acestei informații. Această necesitate, împreună cu datele de difracție a razelor X precum și cu observația lui Chagaff că în moleculele de ADN concentrația deoxiadenozin-

nucleotidelor este egală cu concentrația deoxitimidin-nucleotidelor ($A = T$) și concentrația deoxiguanozin-nucleotidelor este egală cu concentrația deoxicitidin-nucleotidelor ($G = C$) i-au condus pe Watson, Crick și Wilkins să propună la începutul anilor 1950 modelul dublu catenar al ADN-ului.

Conform acestui model, ADN este alcătuit din două lanțuri de acizi nucleici care au scheletul zaharid-fosfat orientate spre exterior, iar bazele azotate spre interior. Cele două lanțuri de ADN formează un **dublu helix**, care se formează și este stabilizat datorită **legăturilor de hidrogen** care se formează între bazele purinice și cele pirimidinice (între adenină și timină, respectiv între guanină și citozină). Cuplarea dintre nucleotidele purinice și pirimidinice de pe cele două catene opuse este strict specifică, specificitate dată de legăturile de hidrogen dintre A și T, G și C. Formele predominant tautomere ale bazelor azotate A, G, T și C permite cuplări exclusiv A-T și G-C, aceste baze fiind **două câte două complementare**.

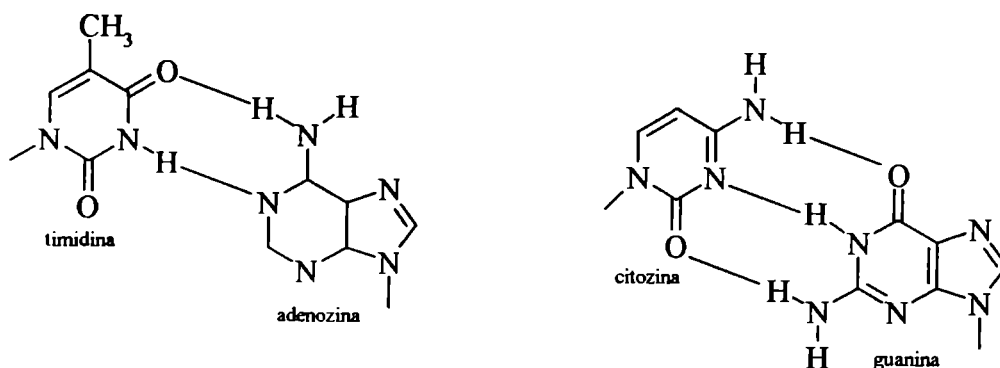


Figura 9.11. Cuplarea bazelor azotate prin legături de hidrogen. Timina se leagă de adenină prin două legături de hidrogen, în timp ce guanina și citozina sunt unite prin trei legături de hidrogen (reprezentate prin linii punctate).

Distanța dintre cele două lanțuri de ADN este relativ constantă, așa încât o purină să se cupleze cu o piridină (dacă s-ar cupla două purine, lanțul ar prezenta o umflătură; dacă s-ar cupla două pirimidine, lanțul ar prezenta o gătuitoră în locul respectiv).

Dubul helix ADN este un helix de dreapta. În această moleculă dublu catenară, este favorizată conformația *anti* a legăturii glicozidice (vezi pag. 210) datorită restricției impuse asupra rotației în jurul legăturii fosfodiesterice.

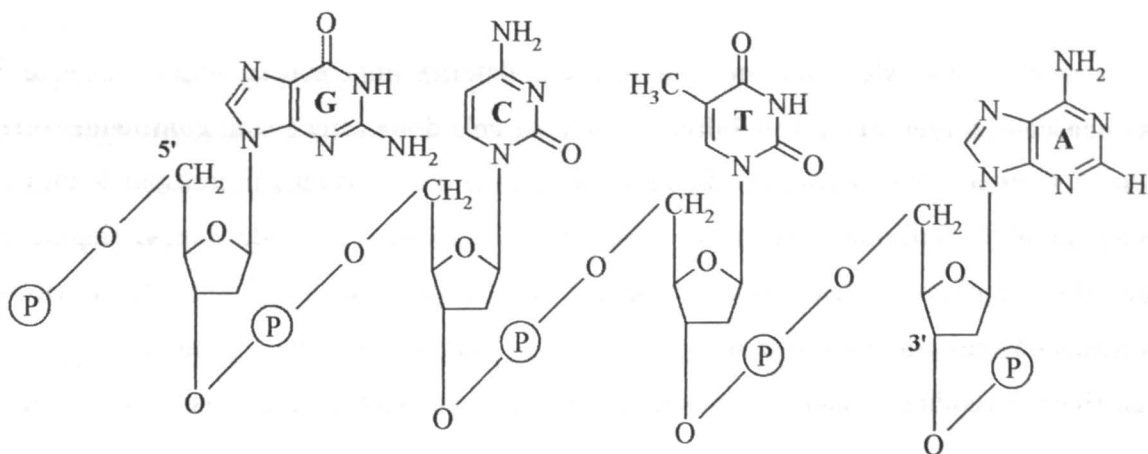


Figura 9.12. Un segment dintr-o catenă de ADN în care bazele azotate guanină (G), citozină (C), timină (T) și adenină (A) sunt unite prin legături fosfodiesterice între ciclurile 2'-deoxiribozice legate de bazele azotate prin legături N-glicozidice. Prin convenție, o secvență de ADN monocatenar se scrie în direcția 5'→3', ca pGpCpTpA, unde „G,C,T,A” reprezintă cele patru baze azotate, iar „p” reprezintă punțile fosfodiesterice.

Cele două catene ale dublului helix posedă polaritate și sunt **antiparalele**: o catenă este orientată 5'→3', iar cealaltă 3'→5'.

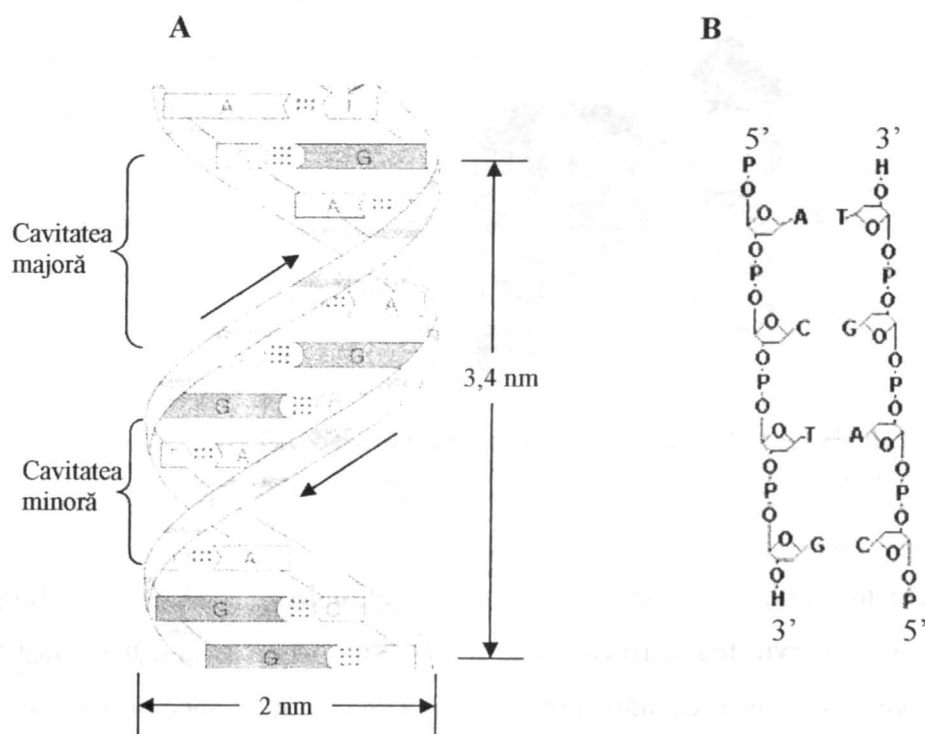


Figura 9.13. A. Modelul structurii spațiale dublu elicoidale a ADN, forma B. **B.** Orientarea antiparalelă a celor două catene polinucleotidice din structura ADN.

Cele două catene nu sunt identice, dar datorită împerecherii bazelor azotate fiecare devine **replica complementară a celeilalte**. Spunem că cele două catene sunt **complementare**, în sensul că unui A dintr-o catenă îi corespunde un T sau unui G dintr-o catenă îi corespunde un C. Într-un dublu helix de ADN, informația genetică constă în secvența de nucleotide dintr-o singură catenă, **catena matriță** (template), aceasta fiind catena care este copiată în timpul biosintezei ARN-ului mesager, considerată **catena necodificantă** (non-coding strand). Catenă opusă este considerată **catena codificantă** (coding strand), deoarece se potrivește cu ARN-ul transcris, care este tradus în sinteza proteică.

Pentru a forma dublul helix, catenele complementare se răsucesc în jurul unui ax comun. ADN-ul dublu catenar există în cel puțin șase forme (A-E, și Z). Forma B este cea care se întâlnește în condițiile fiziologice (tărie ionică mică, hidratare puternică). O spiră a ADN-ului de tip B conține zece perechi de baze azotate, înălțimea unei spire fiind de 3,4 nm. Lățimea dublului helix din ADN-ul de tip B (diametrul helixului) este 2 nm.

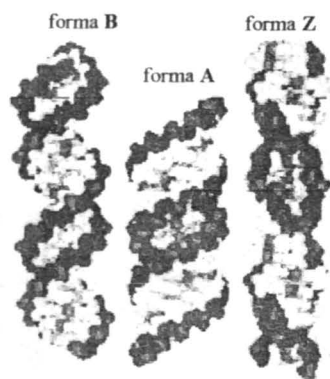


Figura 9.14. Modelul structurii spațiale a trei forme de ADN .
Forma B este cea prezentă în condițiile fiziologice.

La examinarea modelului care reprezintă structura secundară a ADN-ului în forma B, se observă o cavitate mai mare (**cavitatea majoră**, „**major groove**”) și o cavitate mai mică (**cavitatea minoră**, „**minor groove**”). În aceste cavități, proteinele pot interacționa specific (în special prin legături de hidrogen) cu grupările expuse ale nucleotidelor, putând astfel recunoaște și lega specific anumite secvențe nucleotidice, fără a perturba împerecherea bazelor din dublul helix de ADN. Proteinele reglatoare controlează expresia genelor prin astfel de interacții.

Denaturarea ADN

Structura dublu-catenară a ADN poate fi separată în cele două catene componente, prin procesul de **denaturare** sau „**topire**”. Acest lucru poate fi realizat în soluție, prin creșterea temperaturii sau prin scăderea concentrației ionice din soluție. Separarea ADN în cele două catene componente se realizează termic de-a lungul unui interval de temperatură, al cărui mijloc este considerat „**punctul de topire**”, sau T_m (de la engl. *melting temperature*, „temperatura de topire”). T_m al unei molecule de ADN depinde de compoziția în baze azotate și de concentrația ionică a soluției în care are loc denaturarea. Un ADN bogat în perechi G-C (unite prin *trei* legături de hidrogen) va avea un T_m mai mare, în timp ce un ADN bogat în perechi A-T (unite prin *două* legături de hidrogen) va avea un T_m mai mic. O creștere de zece ori a concentrației de ioni monovalenți ridică T_m cu aproximativ 16,5°C. Formamida, care este utilizată în mod frecvent în experimentele cu ADN, destabilizează legăturile de hidrogen, scăzând astfel T_m . Acest lucru permite separarea catenelor din dublu helix ADN sau din speciile hibride ADN-ARN la temperaturi mai mici decât T_m .

Concomitent cu denaturarea ADN are loc și o creștere a absorbanței optice a bazelor purinice și pirimidinice, fenomen cunoscut ca **hipercromicitatea absorbției**.

Renaturarea și hibridarea

Lanțurile monocatenare de ADN se reasociază (**renaturare**) atunci când se crează condiții corespunzătoare de temperatură și concentrație ionică. Viteza de renaturare depinde de concentrația catenelor complementare. Un exemplu de renaturare fiziologică este reasocierea a două lanțuri de ADN complementar dintr-un cromozom ce are loc după replicarea ADN (vezi mai jos). În anumite condiții de temperatură și concentrație ionică, o catenă dintr-un anumit acid nucleic se va asocia strâns numai cu catena complementară.

În condiții corespunzătoare, se pot forma pe bază de complementaritate și duplexuri hibride (ADN-ADN sau ADN-ARN). Când hibridarea este combinată cu tehnica de separare prin electroforeză în gel, rezultă tehnicile de analiză pentru ADN și ARN numite **Southern blotting** și respectiv **Northern blotting**. Aceste tehnici permit identificarea specifică a hibrizilor de ADN sau ARN din amestecuri foarte complexe.

Dimensiunile moleculare ale ADN

Masa moleculară și lungimea macromoleculelor de ADN se caracterizează prin valori remarcabil de mari. Masa moleculară a ADN variază în funcție de proveniență și este de ordinul 10^6 - 10^9 la virusuri și bacterii, putând atinge valori până la 10^{12} în celulele eucariote. Se consideră că la

celulele eucariote corespund 2-3 milioane de gene diferite, fiecare genă reprezentând un fragment precis delimitat și localizat în catenele polinucleotidice de ADN.

9.2.2. Replicarea și transcripția ADN

Informația genetică stocată în secvența nucleotidelor din ADN este utilizată în două direcții. Astfel, ea este sursa informațională pentru sinteza tuturor moleculelor proteice din celule și organism, iar pe de altă parte ea furnizează informația moștenită de celula fiică sau de urmași. Ambele funcții necesită existența unei molecule de ADN care să servească drept „matriță” pentru transcripția informației în ARN (primul caz) sau pentru replicarea informației în molecula fiică de ADN (al doilea caz).

Modelul complementarității catenelor de ADN al lui Watson și Crick sugerează că replicarea moleculei de ADN se face într-o manieră **semiconservativă**. Astfel, când fiecare catenă a dublului helix de ADN parental se separă de catena sa complementară în timpul replicării, fiecare devine o matriță pe care se sintetizează o nouă catenă complementară. Astfel, cele două molecule de ADN nou formate conțin fiecare câte o catenă parentală și câte o catenă nou sintetizată, reciproc complementare. În final, moleculele de ADN rezultate sunt repartizate între două celule fiice, în procesul de diviziune celulară, astfel încât fiecare celulă fiică să conțină aceeași informație genetică cu celula parentală; în fiecare celulă fiică ADN-ul parental este semiconservat.

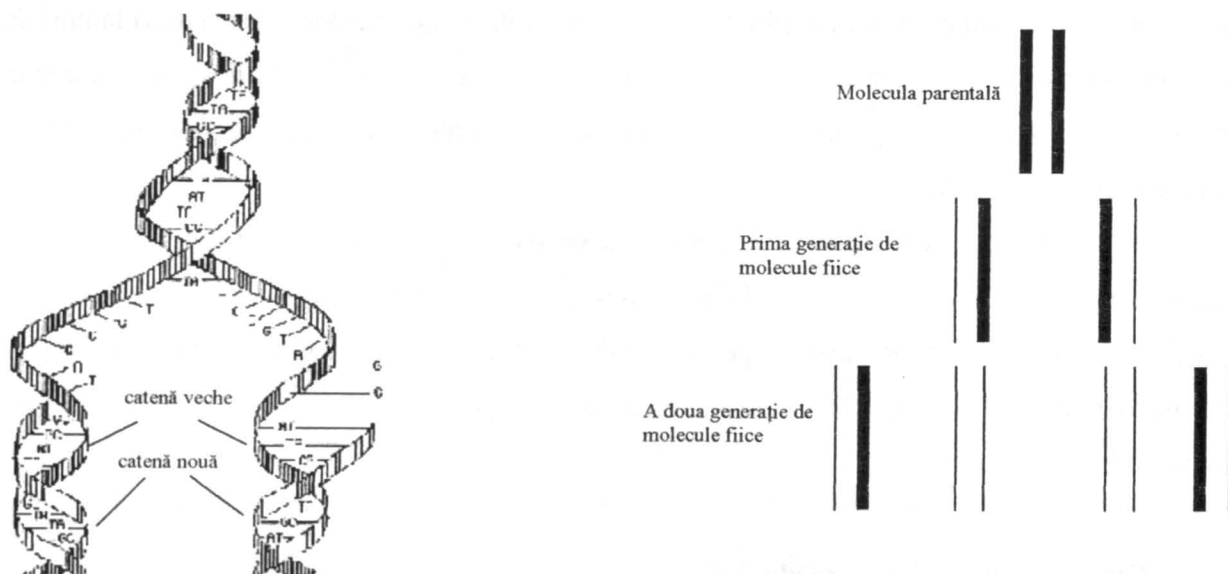


Figura 9.15. Replicarea ADN este semiconservativă. În timpul unei etape de replicare, fiecare din cele două catene este utilizată pentru sinteza unei catene complementare.

9.2.3. Structura ARN

Acizii ribonucleici (ARN) sunt polimeri de ribonucleotide purinice și pirimidinice unite prin legături 3',5'-fosfodiesterice, similar cu ADN.

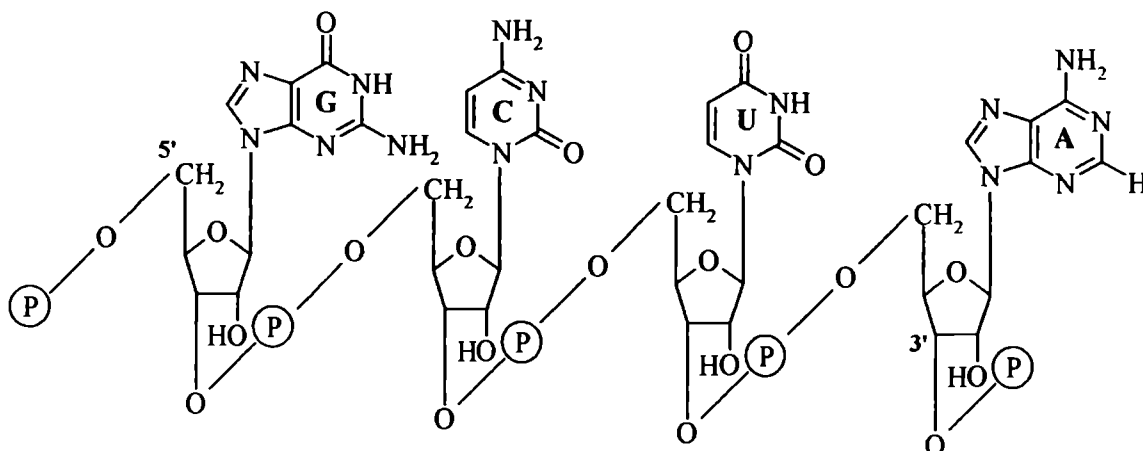


Figura 9.16. Un segment dintr-o moleculă de ARN, în care bazele purinice și pirimidinice sunt unite prin legături fosfodiesterice dintre inelele ribozil, atașate de nucleobaze prin legături N-glicozidice.

ARN este de regulă monocatenar, motiv pentru care nu există egalitate între numărul de G și C, respectiv de A și U din moleculă. Cu toate acestea, și în structura ARN pot exista porțiuni bicatenare (structuri „ac de păr”, **hairpin**), atunci când condițiile de complementaritate sunt îndeplinite.

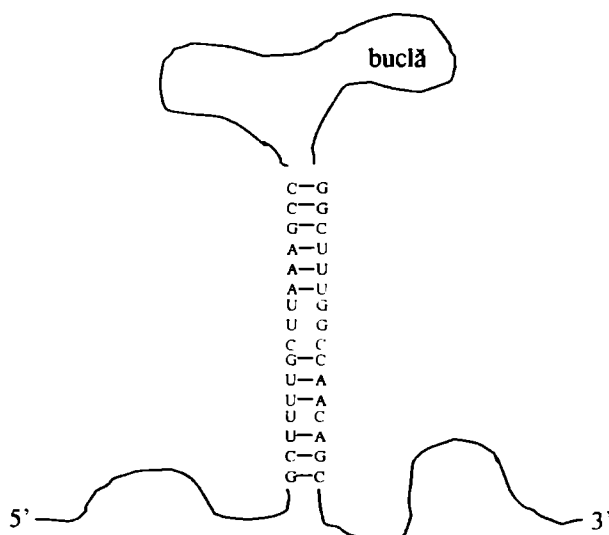


Figura 9.17. Diagrama unei structuri secundare de ARN monocatenar, cu un fragment bicatenar de tip „buclă” (hairpin), format pe bază de complementaritate. În ARN, T este complementar cu U.

ARN este organizat sub forma a trei structuri distincte implicate direct în sinteza proteinelor: **ARN mesager (mARN)**, **ARN de transfer (tARN)** și **ARN ribozomal (rARN)**. Aceste structuri diferă ca mărime, funcție și stabilitate. Toate aceste specii de ARN sunt implicate în sinteza proteinelor, conform schemei de mai jos:

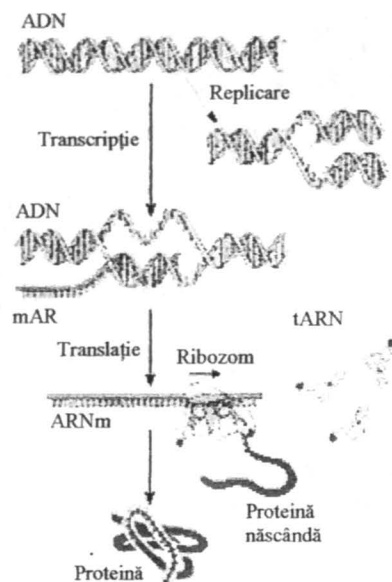


Figura 9.18. Transferul informației genetice de la ADN (gene) la sinteza proteică. Informația genetică conținută în ADN (gene) este transcrisă în nucleu prin sinteza mARN și este citită în procesul de translație care are loc în citoplasmă, la nivelul ribozomilor, cu formarea produsului final (proteina).

9.2.4. ARN mesager (mARN)

Această clasă de ARN este foarte heterogenă atât din punct de vedere al dimensiunilor moleculelor, cât și ca stabilitate. Toți membrii acestei clase funcționează ca mesageri, transferând informația cuprinsă într-un fragment de ADN (genă) spre mașinăria sintetizatoare de proteine, unde mARN joacă rol de matrice pe care o anumită secvență de aminoacizi este sintetizată (vezi Figura 9.17).

Informația dintr-o catenă de mARN este conținută în secvența sa de nucleotide, secvență care este complementară cu catena matrice de ADN (gena) pe baza căreia mARN a fost transcris. Datorită acestei complementarități, o moleculă de ARN se leagă specific (hibridează) de ADN-ul matrice pe baza complementarității bazelor azotate, dar nu se leagă (nu hibridează) cu catena de ADN complementară matricei (catena codificantă). Astfel, secvența de mARN este aceeași cu secvența catenei codificante a genei (cu excepția faptului că în loc de T, în ARN avem U).

Secvență ADN:**Catena**

codificatoare → 5'-ATGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCTATGACCATG-3'

Matriță → 3'-TACACTCGCCTATTGTTAAAGTGTGTCCTTTGTCGATACTGGTAC-5'

mARN (transcript) 5' pAUGUGAGCGGAUAACAAUUUCACACAGGAAACAGCUAUGACCAUG -3'

Figura 9.19. Relația dintre secvența din mARN și gena sa. Transcriptul ARN cu polaritate 5'→3' este complementar cu catena matriță care are polaritate 3'→5'. Secvența și polaritatea mARN sunt aceleași ca în catena codificatoare, cu excepția faptului că T este înlocuit de U.

Speciile mARN, cu precădere cele din celulele eucariote, au anumite caracteristici. Astfel, capătul 5'-terminal este „capișonat” (**capped**) cu un 7-metilguanozintrifosfat, care este legat printr-un trifosfat de un 2'-O-metil-ribonucleozid adiacent la gruparea OH din poziția 5'. Structura „capișon” sau „CAP” este implicată în recunoașterea mARN de către sistemul de sinteză proteică și probabil are și rolul de a stabiliza structura mARN prin împiedicarea acțiunii 5'-exonucleazelor. Aparatul de sinteză a proteinelor pornește sinteza proteică cu citirea și translația informației de pe mARN începând cu capătul 5'-terminal. La organismele superioare, capătul 3'-OH terminal al mARN are atașat un polimer alcătuit din 20-250 de resturi adenilat (coada **poliA**). Rolul specific al cozii poliA nu este pe deplin elucidat, dar se pare că menține stabilitatea intracelulară a mARN prin împiedicarea acțiunii 3'-exonucleazelor. Existența cozii poliA face posibilă separarea mARN prin cromatografie pe coloane umplute cu un substrat solid de tipul celulozei funcționalizată cu grupări oligodeoxitimidinice. Dacă un amestec de ARN de diferite tipuri este trecut prin astfel de coloane, vor fi reținuți numai mARN, deoarece cozile lor poliA vor forma legături prin complementaritate cu fragmentele poliT din substratul solid.

În celulele mamiferelor, inclusiv în cele umane, moleculele de mARN prezente în citoplasmă nu reprezintă produșii ARN sintetizați inițial pe matrița ADN, ci sunt procesați înainte de a trece din nucleu în citoplasmă. Astfel, în nucleeele celulelor de mamifere, produșii de transcripție inițial formați constituie o altă clasă de molecule mari de ARN, foarte heterogenă ca dimensiuni (**ARN nuclear heterogen**, sau **hnARN**). Moleculele de hnARN sunt mult mai mari decât cele de mARN și sunt procesate în mARN înainte ca acesta să treacă în citoplasmă pentru a fi citit în sinteza proteică.

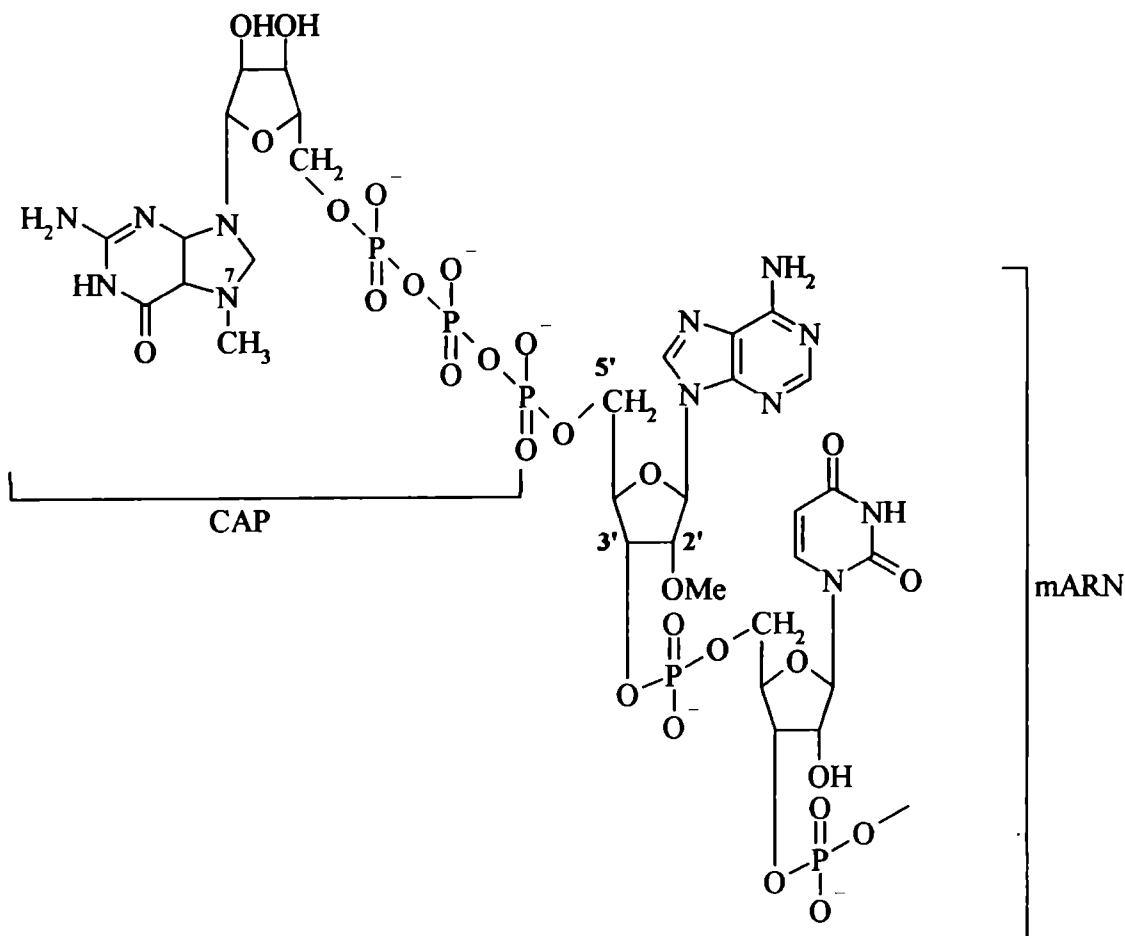


Figura 9.20. Structura „CAP” este prezentă la capătul 5'-terminal la majoritatea mARN din eucariote. Un 7-metilguanozintrifosfat este atașat la capătul 5'-terminal al mARN, care de regulă conține un 2'-*O*-metilpurin-nucleotid. Aceste modificări (structura CAP și gruparea metil) sunt adăugate după transcrierea mARN din ADN.

9.2.4. Codul genetic

Pentru a translați corect informația genetică copiată dintr-o secvență de nucleotide din ADN de către mARN, celulele trebuie să posede un cod care să coreleze secvența de nucleotide cu secvența de aminoacizi din produsul final, proteina. Corespondența dintre secvența de nucleotide și secvența de aminoacizi este dată de **codul genetic**. Conform acestui cod, fiecare aminoacid este codificat de o secvență specifică de trei nucleotide, numite **codon**. Din cei 64 (4^3) codoni posibili, trei nu codifică aminoacizi, fiind denumiți **codoni nonsens**. Codul genetic este **universal** (valabil pentru toate organismele) și **degenerat** (există mai mulți codoni care codifică un singur aminoacid).

Moleculele de mARN nu au nici un fel de afinitate pentru aminoacizi; prin urmare translația informației genetice copiată în mARN în secvența de aminoacizi dintr-o anumită proteină necesită o

moleculă adaptor care să recunoască atât o secvență nucleotidică specifică, cât și aminoacizii corespunzători. Această moleculă adaptor este reprezentată de **ARN de transfer (tARN)**.

Tabelul 9.3. Codul genetic (corespondența între codonii specifici mARN și aminoacizi)

Primul nucleotid	Al doilea nucleotid				Al treilea nucleotid
	U	C	A	G	
U	Phe	Ser	Tyr	Cys	U
	Phe	Ser	Tyr	Cys	C
	Leu	Ser	Term*	Term	A
	Leu	Ser	Term	Trp	G
C	Leu	Pro	His	Arg	U
	Leu	Pro	His	Arg	C
	Leu	Pro	Gln	Arg	A
	Leu	Pro	Gln	Arg	G
A	Ile	Thr	Asn	Ser	U
	Ile	Thr	Asn	Ser	C
	Ile	Thr	Lys	Arg	A
	Met**	Thr	Lys	Arg	G
G	Val	Ala	Asp	Gly	U
	Val	Ala	Asp	Gly	C
	Val	Ala	Glu	Gly	A
	Val	Ala	Glu	Gly	G

*Term = codon care codifică terminarea sintezei proteice

**AUG, codonul care codifică metionina, reprezintă și „codonul de start”, semnalizând locul de începere a sintezei proteice.

9.2.5. ARN de transfer (tARN)

Moleculele de ARNt variază în lungime de la 74 la 95 nucleotide și servesc ca **adaptor** pentru traslația informației din mARN în secvența de aminoacizi din proteine. Există cel puțin 20 specii de tARN în celule, câte una pentru fiecare aminoacid necesar pentru sinteza proteică. Deși fiecare tip de tARN este diferit de ceilalți prin secvența sa specifică de nucleotide, toți au anumite caractere comune. Astfel, structura lor primară (secvența de nucleotide constituente) permite tuturor tipurilor de tARN să se plieze în același mod, rezultând o structură secundară comună tuturor tipurilor de tARN, asemănătoare unei frunze de trifoi (Figura 9.21).

Toate moleculele de tARN conțin patru brațe. **Brațul acceptor** se termină cu secvența CpCpA-OH, aceste trei nucleotide fiind adăugate posttranscripțional. Aminoacidul specific unui anumit tARN este atașat la groparea 3'-OH al restului A din brațul acceptor. Brațele D, T ψ C și „apendicele” sunt specifice.

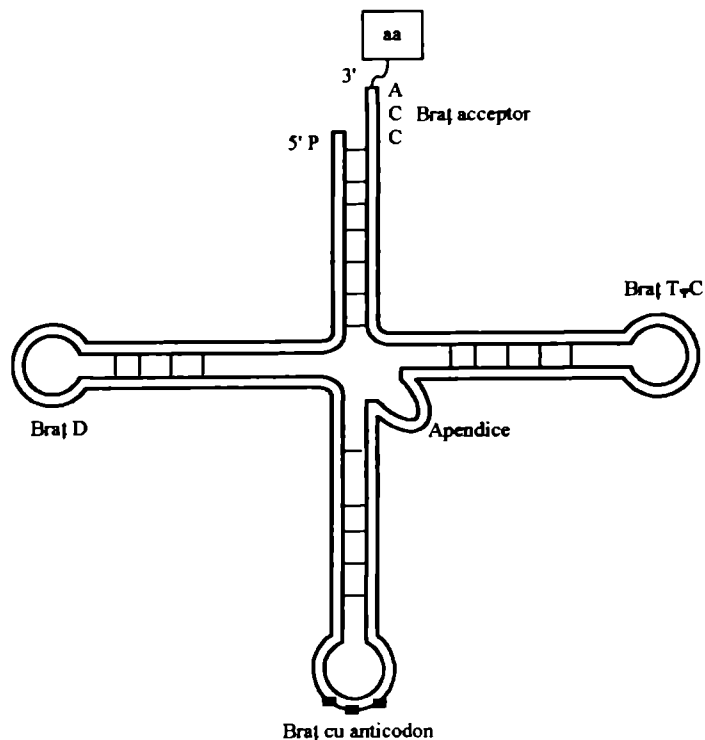


Figura 9.21. Structura secundară a unui tARN. La capătul 3'-CAA-terminal se atașează aminoacidul pentru care tARN este specific.

9.2.6. ARN ribozomal (rARN)

Ribozomii reprezintă structuri citoplasmice nucleoproteice la nivelul cărora are loc sinteza proteică pe matrița de mARN. La nivelul ribozomilor, moleculele de mARN și tARN interacționează pentru a sintetiza o proteină în procesul de translație (traducere) a informației transcrisă (copiată) de mARN din gena codificatoare. În timpul sintezei proteice, mai mulți ribozomi se atașează la o moleculă de mARN, formând o structură numită **polizom**.

Un ribozom dintr-o celulă de mamifer are o greutate moleculară de aproximativ $4,2 \times 10^6$ și o viteză de sedimentare de 80S (unități Svedberg); componentele sale sunt prezentate în Tabelul 9.4.

Tabelul 9.4. Componentele unui ribozom de mamifer

Component	Masa	Proteine		ARN		
		Număr	Masă	Mărime	Masă	Număr de baze
Subunitatea 40S	$1,4 \times 10^6$	~ 35	7×10^5	18S	7×10^5	1900
Subunitatea 60S	$2,8 \times 10^6$	~ 50	1×10^6	5S	35 000	120
				5,8S	45 000	160
				28S	$1,6 \times 10^6$	4700

Ribozomul mamifer conține două subunități nucleoproteice majore: subunitatea mare (60S), cu masă moleculară $2,8 \times 10^6$ și o subunitate mai mică (40S) cu masă moleculară $1,4 \times 10^6$. Subunitatea 60S conține ARN ribozomal (rARN) 5S, 5,8S și 28S, alături de mai bine de 50 polipeptide specifice. Subunitate 40S este mai mică și conține rARN 18S și aproximativ 30 proteine distincte. Toate speciile de ARN ribozomal cu excepția ARN 5S sunt procesate dintr-un precursor comun 45S, la nivelul nucleolului. rARN 5S este transcris într-un proces independent. ARN ribozomal este puternic metilat și este „împachetat” cu proteinele ribozomale specifice la nivelul nucleolului înainte de a fi trimis în citoplasmă. În citoplasmă, ribozomii sunt relativ stabili, participând la multe cicluri de translație pentru sinteza proteinelor. Funcțiile moleculelor de rARN nu sunt pe deplin elucidate, dar ele sunt necesare pentru asamblarea ribozomilor și se pare că joacă un rol cheie în legarea mARN la ribozom. Studii recente sugerează faptul că un anumit tip de rARN ar avea activitate de peptidil-transferază, acționând ca o enzimă (ribozimă).

9.2.7. ARN nuclear de mici dimensiuni (snARN)

La toate speciile de eucariote se întâlnesc specii distincte de ARN, care nu sunt implicate direct în sinteza proteică, dar care au un rol esențial în procesarea ARN și în reglarea expresiei genelor. Aceste specii de ARN au dimensiuni mici (90-300 nucleotide) și sunt denumite **ARN nuclear de mici dimensiuni, snARN** (small nuclear RNA). Majoritatea moleculelor de snARN sunt asociate cu proteine, formând **riboproteine** distribuite în nucleu și citoplasmă, fiind prezente în număr de 100 000-1 000 000 copii/celulă.

9.2.8. Nucleazele

Enzimele care catalizează degradarea acizilor nucleici se numesc nucleaze, ele putând fi clasificate după mai multe criterii. Nucleazele care manifestă specificitate pentru ADN sunt denumite **deoxiribonucleaze**, iar cele care manifestă specificitate pentru ARN, **ribonucleaze**. În cadrul acestor două clase se disting enzimele care hidrolizează legăturile fosfodiesterice interne (**endonucleaze**) sau la capăt de catenă (**exonucleaze**). Exonucleazele acționează numai într-o singură direcție (3'→5' sau

5'→3'). Unele nucleaze pot hidroliza numai molecule dublu catenare, altele exclusiv monocatenare. Există și clase de endonucleaze care recunosc numai o secvență specifică de baze. Acestea sunt denumite **enzime de restricție**; ele reprezintă unelte importante de lucru în biologia moleculară, genetică și științele medicale.

Bibliografie Selectivă

Lippincott's Illustrated Reviews: Biochemistry/ Champe, P; Harvey, R. A.; Ferrier, D. R., Williams & Wilkins, 2004

Basic Medical Biochemistry: A Clinical Approach/ Marks, D. B.; Marks, A. D.; Smith, C. M., Williams & Wilkins, 2004

Harper's Illustrated Biochemistry / Murray, R.K.; Granner, D.K.; Mayes, P.A.; Rodwell, V.W., International Edition, 2003

Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations (5th Edition)/ Devlin, T. M. (ed.), John Wiley & Sons, 2002

Medical Biochemistry (4th edition)/ Bhagavan, N. V., Academic Press, 2002

Organic Chemistry (3rd Edition)/Yurkanis Bruice, P. Prentice Hall Inc, 2002

Instant Notes in Biochemistry / Hames, B.D.; Hooper, N. M., Taylor & Francis Books Ltd, 2000.

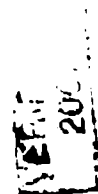
Chemistry for the Life Sciences / Sutton, R.; Rockett, B.; Swindells, P., Taylor & Francis, London, 2000.

Biomedical Chemistry: Applying Chemical Principles to the Understanding and Treatment of Disease/ Torrence, P. F. (ed.), John Wiley / Sons, 2000

Peptide Science - Present and Future / Shimonishi, Y., Ed. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1999.

Principles of Medical Biochemistry/ Meisenberg, G; Simmons, W. H., Mosby Inc., 1998

VERIFICAT
2017

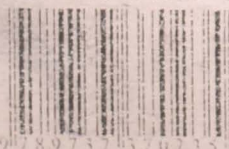


**Tiparul s-a executat sub c-da. nr. 1386/2005 la
Tipografia Editurii Universității din București**



Procesele biochimice normale stau la baza stării de sănătate. Organizația Mondială a Sănătății (OMS) definește starea de sănătate astfel: "nu numai absența bolilor și a infirmităților, ci și o stare de confort fizic, mental și social". Dintr-un punct de vedere biochimic, sănătatea poate fi definită ca starea în care toate miile de reacții intra- și extra celulare care au loc în organism decurg în condițiile care asigură organismului șanse maxime de supraviețuire în stare funcțională. Desigur, acesta este un punct de vedere simplist și reducător, fiind evident că pentru a putea monitoriza starea de sănătate a unui organism este nevoie de cunoașterea aprofundată a principiilor biologice, dar și a celor psihologice și sociale.

ISBN 973737023-6



180 000 lei
18 lei noi